

Санкт-Петербургский государственный университет

Грехнёв Дмитрий Александрович

## **Депо-управляемый вход кальция во взрослых кардиомиоцитах мышцы**

Выпускная квалификационная работа

по направлению подготовки биология  
основная образовательная программа бакалавриата 06.03.01

Работа выполнена в лаборатории ионных  
каналов клеточных мембран  
Института Цитологии РАН, (зав. лаб.  
д.б.н. Казначеева Елена Валентиновна)  
Научный руководитель:  
к.б.н. с.н.с. Вигонт Владимир  
Александрович;  
к.б.н. доц. Цветкова Елена Викторовна

Санкт-Петербург  
2018

## Содержание

Список используемых сокращений.....	стр3
Введение.....	стр4
Цели и задачи исследования.....	стр5
1.Обзор литературы.....	стр6
1.1 Гомеостазис кальция в клетке.....	стр6
1.2 Особенности кальциевой сигнализации в кардиомиоцитах.....	стр7
1.3 Депо-управляемый вход кальция.....	стр10
1.4 Белковый аппарат депо-управляемого входа кальция.....	стр11
1.5 Особенности депо-управляемого входа кальция в кардиомиоцитах.....	стр13
1.6 Мышиная модель заболевания миодистрофии Дюшенна.....	стр15
2. Материалы и методы.....	стр17
2.1 Получение первичной культуры желудочковых кардиомиоцитов взрослой мыши ( <i>Mus musculus</i> ) .....	стр17
2.2 Получение лизатов желудочковых кардиомиоцитов взрослой мыши ( <i>Mus musculus</i> ).....	стр17
2.3 Электрфорез и иммуноблоттинг .....	стр18
2.4 Электрофизиологические исследования.....	стр19
2.5 Растворы для электрофизиологических измерений.....	стр19
3. Результаты и обсуждение.....	стр20
3.1 Оптимизация условий для выделения культуры кардиомиоцитов желудочков сердца взрослой мыши.....	стр20
3.2 Токи кальция через потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа ( $Ca_v1.2$ ).....	стр21
3.3 Депо-управляемые токи, соответствующие CRAC-каналам ( $I_{CRAC}$ ) .....	стр22
3.4 Экспрессия белков аппарата депо-управляемого входа кальция .....	стр26
Заключение.....	стр30
Выводы.....	стр31
Список цитируемой литературы.....	стр32

## Список используемых сокращений

Ca<sub>v</sub>1.2 (voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels) потенциал-управляемые кальциевые каналы 1.2  
CRAC channels (Calcium Release Activated Calcium channels) кальциевый канал, активируемый высвобождением кальция  
DAG (Diacylglycerol) диацилглицерол  
GPCRs (GProtein Coupled Receptors) рецепторы сопряженные с G белками  
IP<sub>3</sub> (Inositol 1,4,5-trisphosphate) инозитол-1,4,5-трисфосфат  
IP<sub>3</sub>R (Inositol trisphosphate receptors) рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата  
K<sub>v</sub> (K<sup>+</sup> voltage channels) потенциал-управляемые калиевые каналы  
Na<sub>v</sub>1.5 (Na<sup>+</sup> voltage channels) потенциал-управляемые натриевые каналы 1.5  
PLC (Phospholipase C) фосфолипаза C  
PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase) кальциевая АТРаза плазматической мембраны  
RyR (Ryanodine receptors) рианодиновый рецептор  
SERCA (Sarco/endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) кальциевая АТРаза эндоплазматического ретикулума  
SOCE (Sore-Operated Calcium Enter) депо-управляемый вход кальция  
SOCCs ( Sore-Operated Calcium Channels) депо-управляемые каналы  
STIM1/2/1Large (Stromal Interaction Molecule)  
TRPC (Transient Receptor Potential Canonical)

## Введение

Кальций — один из наиболее распространенных вторичных мессенджеров, вовлеченных в многочисленные сигнальные каскады. Посредством локальных осцилляций кальция и колокализованного взаимодействия с молекулярным окружением достигается инвариантность передачи сигнала по строго заданному пути. В целом, кальциевый сигналинг вовлечен в большинство клеточных процессов от пролиферации и дифференцировки клеток до сократительной способности миоцитов и апоптоза. Поэтому поддержание гомеостаза кальция в клетке жизненно важно и строго регулируется, а нарушение кальциевого гомеостаза может приводить к тяжелым патологиям (Betzenhauser et al., 2015)

В настоящее время бурное развитие получила область медицины, занимающаяся каналопатиями. Каналопатии — это группа заболеваний, связанных с нарушениями функционирования ионных каналов (Baker et al., 2018), в частности кальциевых каналов (Betzenhauser et al., 2015). По данным Всемирной организации здравоохранения на сегодняшний день сердечные патологии занимают первое место в мире среди причин, приводящих к летальному исходу. Показано, что происходит угнетение насосной функции сердца и развитие аритмий из-за дисфункции потенциал-зависимых кальциевых каналов (Betzenhauser et al., 2015) и рианодинового рецептора (Marx & Marks, 2013).

Одним из наиболее распространенных типов притока кальция внутрь клетки является вход кальция через депо-управляемые каналы. Нарушения депо-управляемого входа кальция отмечались при исследованиях различных заболеваний (Agnese Secondo et al., 2018). Однако, вовлеченность депо-управляемого входа кальция в развитие сердечных патологий остается противоречивой. В частности, высказывались гипотезы, что депо-управляемый вход кальция отсутствует в нормальных зрелых кардиомиоцитах (Pan et al., 2014; Zhao et al., 2015), проявляясь лишь в ранний постнатальный период (Voelkers et al., 2010; Luo et al., 2012). Появляются работы, показывающие нарушение функций кардиомиоцитов при дисфункциях STIM1 (Stromal Interaction Molecule) и белков семейств Orai и TRPC (Transient Receptor Potential Canonical), традиционно относящихся к аппарату, обеспечивающему функционирование депо-управляемых каналов в различных клетках (Collims et al., 2013; Sabourin et al., 2016). Возможно, что депо-управляемый вход кальция начинает играть важную роль в зрелых кардиомиоцитах только при развитии патологических процессов (Wen et al., 2011; Luo et al., 2012). Таким образом, депо-управляемые кальциевые каналы могут стать новой потенциальной мишенью для воздействия лекарственных агентов при терапии сердечных заболеваний. Несмотря на высокую актуальность изучения депо-управляемых каналов, на данный момент в мире практически отсутствуют электрофизиологические записи их активности в зрелых кардиомиоцитах.

Основная часть данной работы направлена на измерение депо-управляемого входа кальция в нормальных клетках и при патологии, что позволит разрешить вопрос о наличии функционального депо-управляемого входа кальция в зрелых кардиомиоцитах мыши и оценить вовлеченность депо-управляемого входа кальция в развитие такой сердечной патологии, как миодистрофия Дюшенна.

## **Цель и задачи исследования**

Цель данной работы: электрофизиологическая регистрация депо-управляемого входа кальция в кардиомиоцитах желудочков сердца взрослой мыши как у мышей дикого типа, так и у модельной линии мышей с миодистрофией Дюшенна - mdx. В рамках поставленной цели были выдвинуты следующие задачи:

1. подобрать оптимальные условия для выделения культуры кардиомиоцитов желудочков сердца взрослой мыши;
2. подобрать условия для проведения электрофизиологической регистрации депо-управляемых каналов в зрелых кардиомиоцитах мыши методом локальной фиксации потенциала (patch clamp) в условиях отведения от целой клетки (whole cell);
3. получить записи активности депо-управляемых каналов в зрелых кардиомиоцитах мыши и исследовать их чувствительность к известному блокатору депо-управляемого входа кальция - 2-APB.
4. сравнить содержание белков в кардиомиоцитах желудочков сердца взрослой мыши, задействованных в депо-управляемом входе кальция у мышей дикого типа с линией mdx.

# 1. Обзор литературы

## 1.1 Гомеостазис кальция в клетке

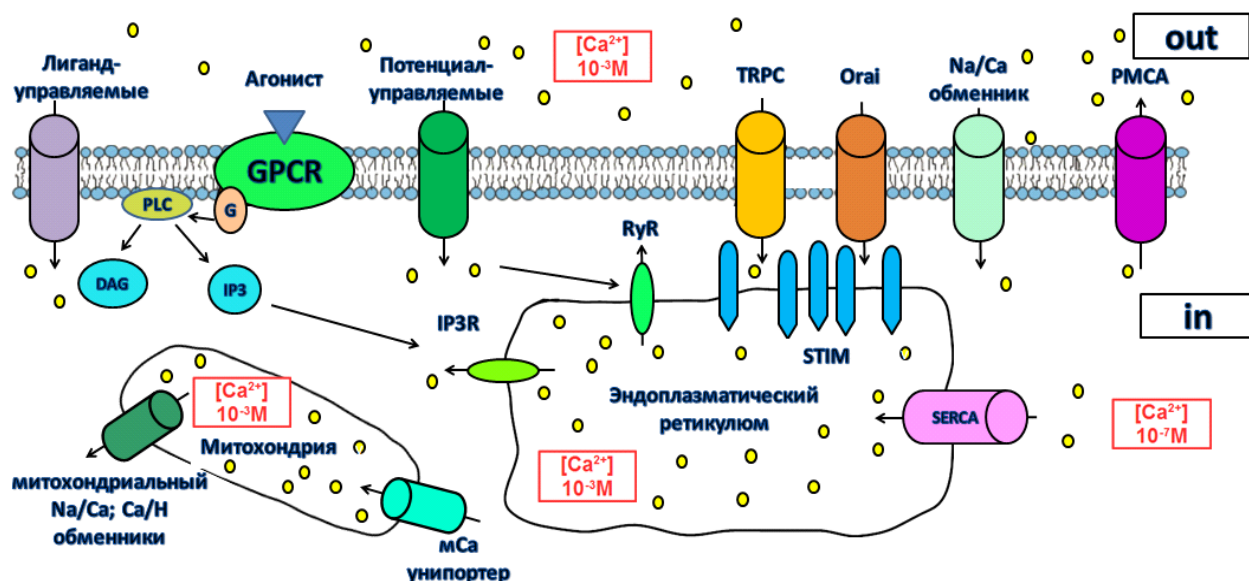
Ещё до появления работ связанных со способами передачи сигнала внутри клетки, было известно, что ионы кальция являются важнейшим структурным компонентом костей, зубов. Известный хирург своего времени Эстли Купер отмечал, что в старости кости истончаются и становятся губчатыми по структуре ("thin in their shell and spongy in their texture") (Astley Cooper, 1824). Однако, только в конце XX века с развитием методических подходов в биологии внимание исследователей сосредоточилось на способах передачи внутриклеточных сигналов. Было установлено, что транспорт различных ионов и постоянство их концентрационного состава в различных компартментах внутренней среды организма является основой для осуществления различных физиологических функций. В 1984 году был предложен способ измерения концентрации кальция в цитозоле с помощью флуоресцентных зондов (Tsien et al., 1984). В дальнейшем стали появляться работы, сообщающие об участии кальция в пролиферации клеток, проведении нервного импульса, сократительной способности миоцитов, иммунологических реакциях, а также о том, что длительное увеличение концентрации кальция в цитозоле приводит к клеточной гибели (Barridge et al., 1997; 1998). Таким образом, вовлеченность кальция в разнообразные клеточные процессы требует наличия в клетке механизмов его регуляции.

В отличие от различных органических дериватов, ионы не могут подвергаться метаболическим превращениям и, как следствие, в эволюции сформировались особые системы регуляции содержания ионов в клетке. В состоянии покоя внутриклеточная концентрация кальция поддерживается на очень низком уровне  $10^{-7}$  М (Parekh & Putney 2005). Данное свойство обусловлено обособлением цитозоля клетки от внешней среды полупроницаемой плазматической мембраной, через которую с помощью специальных белков осуществляется транспорт большинства веществ, а также наличием в клетке органелл, способных аккумулировать ионы кальция, так называемых кальциевых депо. Поступление ионов кальция из внеклеточного пространства внутрь клетки осуществляется через ионные каналы, среди которых можно выделить следующие типы: потенциал-управляемые каналы, лиганд-управляемые каналы и, так называемые, депо-управляемые каналы (Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels – SOCCs). В свою очередь из внутриклеточных кальциевых депо — эндо/саркоплазматический ретикулум — кальций поступает в цитозоль посредством активации ионотропных рецепторов инозитол-3-фосфата (inositol-1,4,5-trisphosphate receptors  $\text{IP}_3\text{R}$ ) и рианодиновых рецепторов (ryanodine receptors  $\text{RyR}$ ). Также в клетках есть переносчики, осуществляющие вторично-активный транспорт, — ионные обменники. Например, в электровозбудимых клетках есть Na/Ca-обменник, который работает по принципу антипортера, используя градиент ионов натрия, создаваемого Na/K-АТФазой, выкачивает один ион кальция, в обмен захватывая три иона натрия в клетку, а так же Ca/H -обменник.

Другим способом поддержания низкой концентрации кальция в цитозоле служат кальцийсвязывающие белки. Мишенями для кальция служат кальцийсвязывающие домены, например, EF-hand и ему подобные. В свою очередь из-за различий в устройстве EF-доменов белки могут обладать как низкой, так и высокой аффинностью к кальцию. На основании этого свойства их можно подразделить на забуферивающие, с низкой аффинностью к кальцию, например, парвальбумин и сенсоры, с высокой аффинностью к кальцию, например, кальмодулин. Забуферивающие кальциевые белки будут выполнять протекторную функцию, а сенсоры участвовать в сигнальной трансдукции.

В целом, динамическое равновесие концентрации кальция в цитозоле поддерживается за счет слаженной работы АТФазы эндо/саркоплазматического ретикулума SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) и плазматической мембраны PMCA

(Plasma Membrane Calcium ATPase), работы ионных каналов и транспортеров, забуферивания кальция митохондриями и кальций-связывающими белками. Основные пути транспорта кальция в клетке показаны на рис.1.1.



**Рис.1.1. Поддержание гомеостаза кальция в клетке.** На рисунке стрелками показаны основные пути транспорта кальция в клетке. В норме концентрация кальция в цитозоле поддерживается на очень низком уровне, а кальций аккумулируется в клеточных депо: митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме, а также во внеклеточном пространстве. Из экстраклеточного пространства в цитозоль кальций поступает через потенциал-управляемые, лиганд-управляемые, депо-управляемые (TRPC и Orai) каналы, а также через Na/Ca обменник. Из клеточных депо в цитозоль кальций поступает через рианодиновые, инозитол-3-фосфатные рецепторы эндоплазматического ретикулума и митохондриальные протонный и натрийкальциевый обменники. ATPазы плазматической мембраны (PMCA) выкачивают кальций из цитозоля во внеклеточное пространство. ATPазы эндоплазматического ретикулума (SERCA), а также специальные митохондриальные кальциевые транспортеры закачивают кальций в депо.

Кроме того отмечается, что входящий в клетку кальций диффундирует на крайне незначительные расстояния порядка 0.1-0.5 мкм прежде чем свяжется с белком (Allbritton et al., 1992), а чтобы минимизировать количество входящего в клетку кальция его поступление осуществляется в виде коротких осцилляций различной частоты (Barridge et al., 1997). Тем не менее, этого оказывается достаточно для передачи сигнала, так как не менее важную роль в сигналинге играет колокализация молекулярных посредников. Данная колокализация может осуществляться как с помощью специальных белков скэффолда, связывающих группу белков, так и особенностями клеточной организации, которую рассмотрим подробнее на примере кардиомиоцитов.

## 1.2 Особенности кальциевой сигнализации в кардиомиоцитах

Символично, что начало изучению кальциевой сигнализации было положено на кардиомиоцитах. В опытах на изолированном сердце лягушки Рингер впервые отметил, что для сокращения сердца необходима одна тысячная доля хлорида калия, однако при повторных опытах с растворами, приготовленными на дистиллированной воде, результат оказался отрицательным. Выяснилось, что лаборант для проведения опытов использовал водопроводную воду, в которой, как известно, содержатся различные катионы металлов, в том числе кальций. В дальнейшем Рингером было установлено, что ионы кальция являются тем фактором, который необходим для поддержания сократительной функции сердца. Были разработаны физиологические растворы с оптимальным соотношением

ионов, которые используются в практике до настоящего времени (раствор Рингера, Тирода) (Ringer 1883). Сердце благодаря наличию собственной проводящей системы, включающей синоатриальный, атриовентрикулярный узлы, пучок Гиса, распадающийся в конечном счете на волокна Пуркинье, обладает свойством автоматии. Данные структуры способны самостоятельно генерировать потенциал действия и задавать ритм сокращения сердца. Гистологической особенностью кардиомиоцитов является то, что клетки между собой формируют соединения — вставочные диски. Такие волокна кардиомиоцитов образуют функциональный синцитий, что обеспечивает скоординированное распространение потенциала действия по всему сердцу (Bers, 2001).

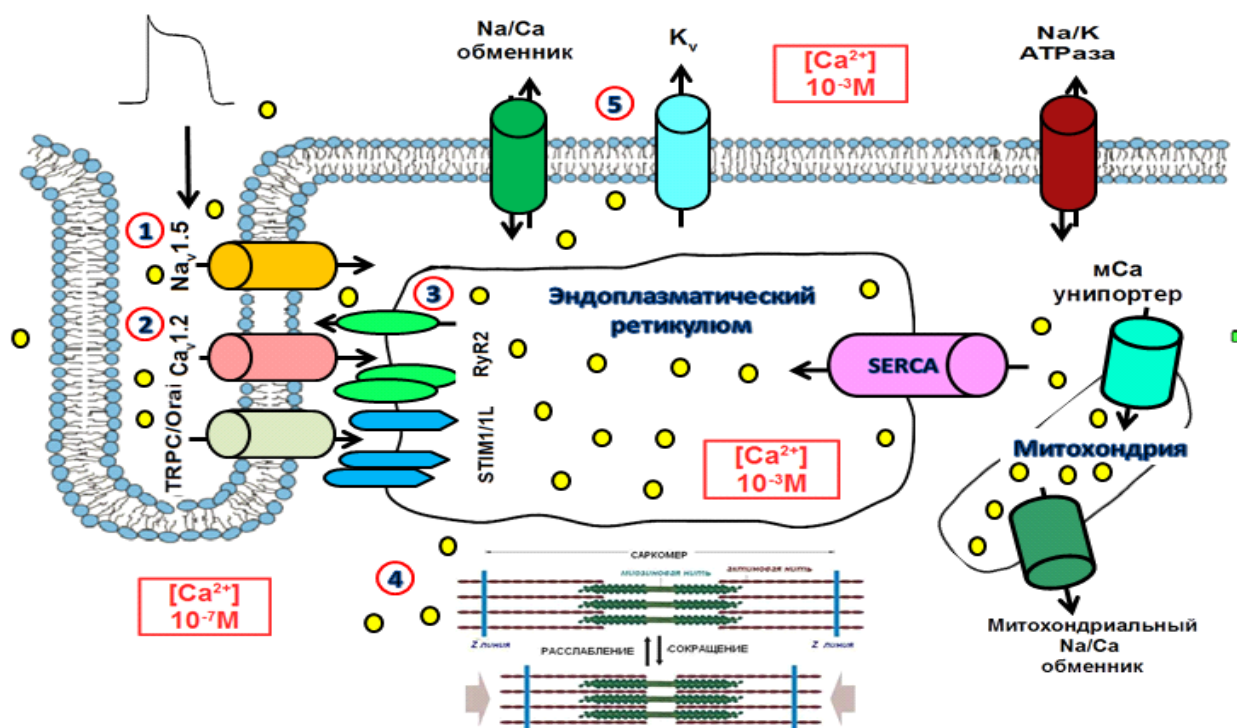
Кардиомиоциты в отличие от других клеток имеют ряд особенностей, связанных с транспортом кальция в клетки. Их мембрана имеет складчатые структуры, называемые Т-трубочками, которые плотно примыкают к мембранам саркоплазматического ретикулума, тем самым обеспечивая колокализацию потенциал-зависимых каналов L-типа ( $Ca_v1.2$ ) на плазматической мембране с рианодиновыми рецепторами ( $RyR2$ ) на мембране саркоплазматического ретикулума. (Bers, 2001).

В результате распространения потенциала действия лавинообразно активируются потенциал-зависимые натриевые каналы ( $Na_v1.5$ ). Резкое поступление положительно заряженных частиц деполяризует мембрану и активирует кальциевые каналы L-типа ( $Ca_v1.2$ ), через которые входящие в цитозоль ионы кальция активируют рианодиновые рецепторы. Активированные таким способом рианодиновые рецепторы осуществляют выброс кальция из саркоплазматического ретикулума в цитозоль, где ионы кальция связываются с соответствующими мотивами белков тропонин-тропомиозинового комплекса. Связывание кальция с тропонином С запускает изменение конформации тропонин-тропомиозинового комплекса, что приводит к открытию сайтов связывания миозиновых головок с актином, а наличие при этом АТФ запускает мышечное сокращение. (Bers, 2001).

Впоследствии, концентрация цитоплазматического кальция приходит в норму за счет работы кальциевых АТФаз,  $Na/Ca$  обменника и депонирования кальция в митохондриях. В период рефрактерности сердце не может совершать сокращения. К этому времени усиливается ток положительно заряженных частиц из клетки через потенциал-управляемые калиевые каналы ( $K_v$ ) и восстанавливается изначальный потенциал покоя. Таким образом, осуществляется сопряжение процесса возбуждения клетки с ее сокращением.

Возникшая в результате данного процесса разница концентраций ионов калия и натрия между внеклеточным пространством и цитозолем восстанавливается под действием  $Na/K$  АТФазы, которая выкачивает ионы натрия из клетки и закачивает ионы калия внутрь клетки. (Bers, 2001). Данные процессы показаны на рисунке 1.2.





**Рис.1.2 Особенности кальциевой сигнализации в кардиомиоцитах.** На рисунке стрелками показаны основные пути транспорта кальция в кардиомиоцитах обеспечивающих сопряжение процессов возбуждения и сокращения клетки. Мембрана кардиомиоцитов содержит Т-трубочки, где колокализованы потенциал управляемые кальциевые, натриевые каналы и депо-управляемые каналы, которые также колокализованы с мембранными белками эндоплазматического ретикулума: рианодиновыми рецепторами (RyR2) и белками STIM1/1L). Цифрой 1 показана активация потенциал управляемых натриевых каналов (Na<sub>v</sub>1.5) под действием электрического импульса, приводящая к деполяризации мембраны клетки. Цифрой 2 показана активация потенциал-управляемых кальциевых каналов (Ca<sub>v</sub>1.2), приводящая к поступлению кальция в цитозоль. Цифрой 3 показан выход кальция из саркоплазматического ретикулума через ионотропные рианодиновые рецепторы (RyR2) в ответ на поступивший кальций через потенциал-управляемые каналы. Цифрой 4 обозначен процесс сокращения кардиомиоцитов в ответ на резкое повышение кальция в цитозоле. Цифрой 5 показана работа потенциал-управляемых калиевых каналов активирующихся при деполяризации мембраны клетки и обеспечивающих ее реполяризацию. Постоянство концентрационного состава ионов натрия и калия поддерживается работой Na/K АТФазы, а ионов кальция за счет АТФаз плазматической мембраны и саркоплазматического ретикулума (SERCA), а также Na/Ca обменника.

Процесс сопряжения возбуждения и сокращения в кардиомиоцитах обеспечивает основную функцию сердца — насосную. Сердечные сокращения обеспечивают циркуляцию крови, а как следствие трофику тканей и процессы газообмена. Нарушение сопряжения, вследствие неконтролируемых поступлений ионов кальция в цитозоль приводит к развитию различных аритмий. Одним из основных способов поступления кальция в цитозоль является вход через потенциал-управляемые кальциевые каналы (Ca<sub>v</sub>1.2), поэтому основные фармакологические агенты для лечения аритмий направлены на инактивацию данных каналов, например, нифедипин, верапамил и уменьшение входа кальция в цитозоль (Betzenhauser et al., 2015).

Однако, существуют и другие пути входа кальция в цитозоль, например, депо-управляемый, функционирование которого обеспечивается белками семейств TRPC, Orai и STIM (рис.1.2).

### 1.3 Депо-управляемый вход кальция

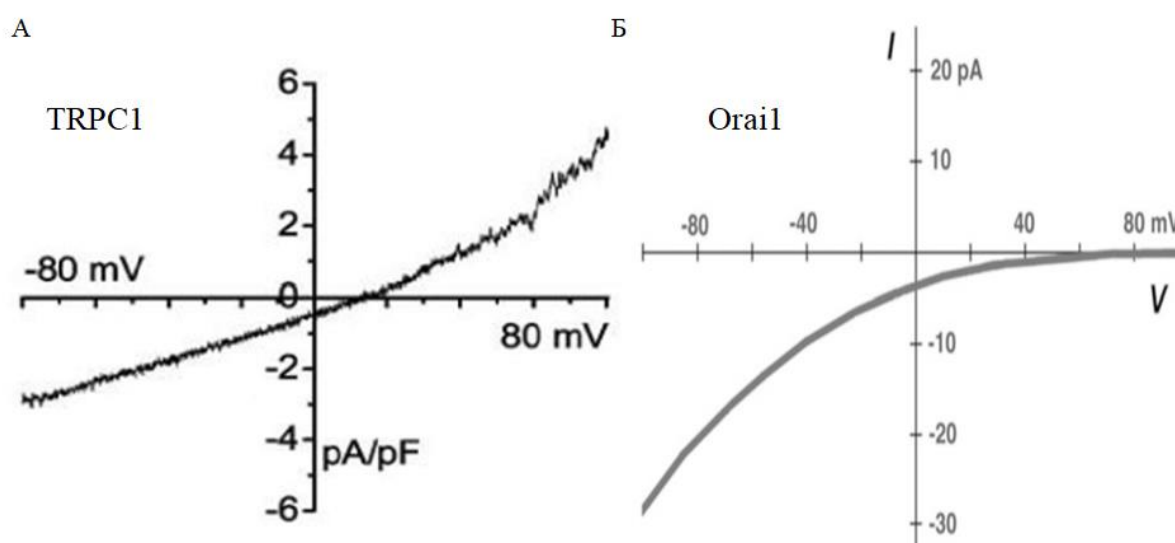
Впервые модель депо-управляемого входа кальция была разработана для электроневозбудимых клеток как способ поступления кальция внутрь клетки из межклеточного пространства в отсутствие потенциал-управляемых каналов. В 1986 году лаборатория Джеймса Патни, предположила, что приток кальция в цитоплазму через плазматическую мембрану может контролироваться путем уменьшения концентрации кальция в клеточных депо. Первоначально этот процесс был назван Емкостной кальциевый вход (Capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  Entry) по аналогии с конденсатором, потому что если депо заполнено а конденсатор заряжен, то ток в цепи не течет, когда начинается разрядка конденсатора и опустошение депо, то развивается ток (Putney, 1986; 1990).

Проверка модели осуществлялась с помощью искусственного опустошения эндоплазматического ретикулума — кальциевого депо клетки. Были найдены антагонисты кальциевых АТРаз эндоплазматического ретикулума (SERCA), например, сесквитерпеновый лактон тапсигаргин. Также установлено, что ингибиторами SERCA являются циклопиазоновая кислота, 2,5-ди-третбутил-1,4-бензогидрохинон (Mason et al., 1991). Кроме того эффект опустошения депо можно вызвать используя низкоаффинный кальциевый хелатор TPEN, связывающий кальций прямо внутри депо. Таким образом, удалось установить, что поступление кальция в цитозоль в ответ на опустошение клеточных депо является одним из основных путей поступления кальция в цитозоль в электроневозбудимых клетках. Позднее Емкостной кальциевый вход был переименован в депо-управляемый вход кальция (SOCE) по аналогии с потенциал-управляемыми каналами.

Долгое время механизм, приводящий к активации депо-управляемых каналов (SOCCs) оставался неизвестен. Разрабатывалось несколько гипотез, например, образование в клетке водорастворимого посредника CIF (calcium influx factor), который при опустошении депо активирует SOCCs (Putney, 1999). Модель связывания белков плазматической мембраны и белков эндоплазматического ретикулума, приводящая к прямому поступлению кальция в депо (Putney, 1990, 1999; Berridge, 1995). В 1990 Кван с коллегами показали, что процесс заполнения кальциевых депо есть результат последовательного транспорта кальция в цитозоль и последующего захвата кальция в эндоплазматический ретикулум с помощью кальциевой АТР-азы SERCA (Kwan et al., 1990). В настоящее время показано, что механизм SOCE обеспечивается взаимодействием белков STIM, кальциевых сенсоров эндоплазматического ретикулума с белками депо-управляемых каналов (SOCCs), что приводит к поступлению кальция из межклеточного пространства в цитозоль (Rosado et al., 2006; 2016).

Благодаря развитию методов молекулярной биологии последующие исследования были направлены на установление молекулярных участников этого процесса. В 2005 году был охарактеризован белок STIM1 в качестве кальциевого сенсора эндоплазматического ретикулума, используя методы основанные на РНК-интерференции были выявлены гены вовлеченные в тапсигаргин индуцированный кальциевый вход (Roos et al., 2005). В 2006 после полногеномного исследования клеток S2 у дрозофилы и картирования генов у пациентов с тяжелым комбинированным иммунодефицитом был идентифицирован белок Orai1 в качестве порообразующей субъединицы каналов депо-управляемого входа кальция (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006). Кроме того показано, что его гомологи Orai2 и Orai3 также участвуют в SOCE и активируются после опустошения депо (Lis et al., 2007; Frischauf et al., 2009).

На данный момент установлено, что депо-управляемый вход кальция осуществляется через каналы двух типов: CRAC-каналы — гомо или гетеромультимерные комплексы, образованные белками Orai и неселективные для кальция SOCCs, образованные белками Orai и TRPC (Desai et al., 2015). В 1992 году Hoth и Penner первыми записали токи через CRAC-каналы ( $I_{CRAC}$ ) на макрофагах (Hoth and Penner, 1992). Тем не менее, очень мало работ, где записаны данные токи на электровозбудимых клетках (Rodríguez-Moyano et al., 2013).  $I_{CRAC}$  являются высоко селективными для ионов кальция с большим потенциалом риверсии и выраженным входящим выпрямлением. В следствии очень маленькой проводимости (1 пСм), измерение тока с одиночных каналов является затруднительным. Напротив, ток через неселективные для кальция SOCCs ( $I_{SOC}$ ) был хорошо охарактеризован в различных клетках, в том числе электровозбудимых (Hunton et al., 2004). Данные каналы обладают большой проводимостью (20 пСм) в отличие от CRAC каналов. Вольт-амперные характеристики депо-управляемых каналов представлены на рис.1.3А,Б.



**Рис.1.3** Вольт-амперные характеристики депо-управляемых каналов (А,Б). (Liu et al., 2007, с изменениями). Неселективные депо-управляемые каналы, образованные белками TRPC (А). Высокоселективные депо-управляемые каналы, образованные белками Orai – CRAC каналы (Б).

#### 1.4 Белковый аппарат депо-управляемого входа

Основной белковый аппарат депо-управляемого входа кальция представлен такими семействами белков как STIM, Orai и TRPC.

Белок STIM1, как кальциевый сенсор, был открыт в 2005г одновременно двумя лабораториями, работающими независимо друг от друга (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). Состоит из 685 аминокислот и имеет массу порядка 90 кДа (Dziadek et al., 2007). STIM1 - это трансмембранный белок, однократно пронизывающий мембрану эндоплазматического ретикулума. Его С конец обращен в цитозоль, а N конец в люмен эндоплазматического ретикулума. В просвете ЭР находятся домены, обозначаемыми как SAM (sterile alpha motif) и два домена EF hand. Неканонический домен EF hand не обладает способностью связывать кальций, но участвует в стабилизации молекулы. Благодаря наличию канонического домена EF-hand, STIM1 может связывать кальций и являться кальциевым сенсором эндоплазматического ретикулума. Показано, что в случае заполненного состояния внутриклеточного кальциевого депо EF-hand/SAM домен

существует в виде  $\alpha$ -спиральной структуры. В такой конформации SAM домен препятствует олигомеризации STIM1. После опустошения депо EF-hand/SAM теряет  $\alpha$ -спиральность и свою компактность и индуцирует агрегацию STIM1 в олигомеры (Dziadek et al., 2007). В случае мутации в EF-hand, приводящей к невозможности связывать кальций, STIM1 при любом состоянии депо (заполнено кальцием или опустошено) находится в кластеризованном состоянии и располагается в мембране эндоплазматического ретикулума в участках сближенных с плазматической мембраной (Dziadek et al., 2007). Таким образом, связывание кальция EF-hand доменом является одним из важнейших эндогенных регуляторных механизмов, приводящим к SAM-зависимым конформационным изменениям внецитозольной области STIM1, необходимым для агрегации STIM1 в кластеры и колокализации этих кластеров в зоне сближенной с плазматической мембраной (Dziadek et al., 2007).

Роль кальциевого сенсора STIM1 заключается не только в активации депо-управляемого входа кальция при понижении концентрации кальция в эндоплазматическом ретикулуме, но и в его инактивации при повышении концентрации кальция в эндоплазматическом ретикулуме. Более того С-терминальный участок белка STIM1 участвует в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой инактивации каналов Orai в результате локального повышения концентрации цитоплазматического кальция (Mullins et al., 2009). STIM1 также активирует депо-управляемые кальциевые каналы образованные белками TRPC1 (Smyth et al., 2010).

STIM2 имеет высокую гомологию аминокислотной последовательности со STIM1 и аналогичную доменную организацию. Однако, EF-hand белка STIM2 имеет более слабую аффинность к кальцию, а следовательно реагирует на меньшие изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ЭР. (Brandman et al., 2007) С другой стороны SAM-домен белка STIM2 медленнее изменяет свою конформацию и запускает олигомеризацию (Zhou et al., 2009). Как и его гомолог STIM1, белок STIM2 выполняет функцию кальциевого сенсора и активирует депо-управляемые каналы. Была показана регуляция каналов Orai белками STIM2. Тем не менее, мало изучено, каким образом происходит совместная регуляция депо-управляемого входа кальция сенсорами STIM1 и STIM2 (Smyth et al., 2010).

Белки Orai1 находят у различных групп животных. У насекомых существует только одна изоформа белка Orai — dOrai. У рыб, амфибий и птиц — две (Orai1 и Orai2). У млекопитающих обнаружено три вида белков Orai: Orai1, Orai2, Orai3 (Shuttleworth, 2012). При этом считается, что белки Orai, особенно изоформа Orai1 играют ключевую роль в поддержании депо-управляемого входа кальция. Из белков Orai1 сформированы высокоселективные для кальция депо-управляемые каналы — CRAC. Подавление экспрессии белков Orai в большинстве типов клеток практически полностью инактивирует депо-управляемый вход кальция в клетку (Lee et al., 2010). В лимфоцитах больных тяжелым иммунодефицитом нарушен гомеостаз кальция. Как оказалось, там экспрессируется мутантная форма белка Orai1 R91W. Экспрессия нормальной формы белка Orai1 полностью восстанавливала депо-управляемый кальциевый вход в таких лимфоцитах (Feske et al., 2006). Большая часть мышей с нокаутом по гену Orai1 умирали во время внутриутробного развития. У немногих выживших наблюдали патологии в развитии Т и В лимфоцитов, тучных клеток, сильное облысение, маленький вес и карликовость.

Семейство белков TRPC (canonical TRP proteins) является подгруппой более крупного белкового семейства TRP (Transient receptor potential). Название семейства связано с объектом, на котором впервые были открыты эти белки: неселективные каналы TRP участвуют в проведении сигнала от фоторецептора дрозофилы.

В состав семейства TRPC входят 7 генов, каждый из которых экспрессируется у млекопитающих. Белок TRPC 2 является псевдогеном для человека, но синтезируется у некоторых других видов млекопитающих. Белки TRPC состоят из шести

трансмембранных доменов, с порой и селективным фильтром между пятым и шестым трансмембранными доменами Роль белков семейства TRPC в формировании депо-управляемых каналов все еще остается дискуссионной. Наибольшее количество убедительных доказательств получено для белков TRPC1 и TRPC3 (Sabourin et al., 2011).

### **1.5 Особенности депо-управляемого входа кальция в кардиомиоцитах**

Ещё за несколько лет до гипотезы Патни в 1981 году Кастеллс и Другман проводили исследования депо-управляемого кальциевого входа на гладкомышечных клетках сосудов (Casteels & Droogmans, 1981). Позднее были получены сведения о существовании депо-управляемого входа кальция в неонатальных кардиомиоцитах (Hunton et al., 2002; Uehara et al., 2002; Collins et al., 2013), а так же в клетках скелетной мускулатуры (Dirksen, 2009; Stiber & Rosenberg, 2011).

Наличие депо-управляемого тока в кардиомиоцитах долгое время оставалось без внимания, так как исследовался большой ток кальция через потенциал-управляемые кальциевые каналы и приводящий к сердечным сокращениям и фактически вклад депо-управляемого тока кальция в нормальную физиологию кардиомиоцитов все ещё остается дискуссионным (Bootman & Rietdorf, 2017). Однако растёт число экспериментов показывающих роль SOCE в физиологических процессах в особенности в неонатальных кардиомиоцитах (Bartoli & Sabourin, 2017). SOCE возникает как результат повышенной активности ионных каналов в процессе активации эмбриональных генетических программ или из-за увеличения активности ионных каналов в течении развития сердечных патологий (Eder & Molkentin, 2011; Luo et al., 2012). Так же были получены сведения о существовании депо-управляемого входа кальция во взрослых кардиомиоцитах (Collins et al., 2013), а так же в клетках скелетной мускулатуры (Dirksen, 2009; Stiber & Rosenberg, 2011). Различные работы показали, что стимуляция кардиомиоцитов тапсигаргином или агонистами активирующими рецепторы сопряженные с G-белками вызывают устойчивый, длительный вход кальция в цитозоль, который не является чувствительным к блокаторам потенциал-управляемых кальциевых каналов и натрий/кальциевого обменника, но чувствительный к перспективным блокаторам SOCE (Kojima et al., 2012). Опустошение саркоплазматического ретикулума также способствует значительному входу кальция в пейсмекерных клетках, выделенных из синоатриального узла мыши, между тем блокаторы SOCE уменьшают амплитуду и частоту спонтанных кальциевых осцилляций и уменьшают содержание кальция в саркоплазматическом ретикулуме (Luo et al., 2015).

Как и для других клеток было показано наличие тех же основных участников SOCE: STIM, Orai и TRPC белков, которые экспрессируются как в неонатальных так и зрелых кардиомиоцитах, где принимают участие в развитии кардиомиоцитов, поддержании гомеостаза и транскрипции генов (Zhu-Mauldin et al., 2012), а независимые исследования показали, что данный аппарат может вносить вклад в развитие гипертрофии сердца и нарушения проводимости (Diomsio et al., 2015).

В кардиомиоцитах экспрессируются три изоформы STIM: STIM1, STIM1L и STIM2 (Zhao et al., 2015), хотя на данный момент мало что известно о роли STIM2 в сердечных клетках. На неонатальных кардиомиоцитах крысы и кардиомиоцитах взрослой крысы показано, что STIM1 и STIM1L локализованы с ключевыми участниками SOCE такими как фосфолеблан, SERCA, RyR (Zhu-Mauldin et al., 2012; Zhao et al., 2015). В неонатальных кардиомиоцитах опустошение саркоплазматического ретикулума приводит к кластеризации STIM1 в областях саркоплазматического ретикулума, сближенных с плазматической мембраной, что обеспечивает их взаимодействие с белками Orai1 (Hulot et al., 2011; Sabourin et al., 2016). В синоатриальном узле STIM1 активирует поступление кальция в цитозоль через Orai1 каналы тем самым модулирует сердечный ритм. Кардиоспецифичная делеция по STIM1 у мышей приводит к опустошению кальциевого

депо - саркоплазматического ретикулума в клетках синоартриального узла и приводит к дисфункции пейсмекеров, что проявляется в урежении сердечного ритма, подавлении генерации электрических импульсов и аномальному ответу на действия парасимпатической системы (Zhang et al., 2015). Однако, есть исследования показывающие, что STIM1 не является обязательным участником активации SOCE в кардиомиоцитах. Zhao и его коллеги показали отсутствие различий в SOCE между контрольными кардиомиоцитами и кардиомиоцитах желудочков сердца с повышенной экспрессией STIM1 (Zhao et al., 2015). Более того лаборатория Parks показала, что STIM1 может кластеризоваться без опустошения кальциевого депо как в неонатальных так и взрослых кардиомиоцитах, аналогичные эффекты наблюдали на клетках скелетной мускулатуры (Parks et al., 2016). Таким образом, роль STIM1 в SOCE кардиомиоцитов все еще остается противоречивой. Установлено, что STIM1 является необходимым компонентом активации транскрипционного фактора NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells), который известен как позитивный регулятор сердечного роста (Heineke & Molkentin, 2006). На кардиомиоцитах показано, что индуцированный ангиотензином 2 и блокированием SERCA вход кальция в цитозоль вызывает перемещение NFAT в ядро (Pang et al., 2002). Показано, что уровень STIM1 увеличивается в ответ на гипертрофию сердца, вызванную пережатием аорты (Luo et al., 2012). Сообщается, что STIM1 зависимый SOCE значительно повышен при сердечной гипертрофии, что показано как *in vitro* так и в кардиомиоцитах взрослой крысы (Hulot et al., 2011). Они показали, что трансфекция кардиомиоцитов с конститутивно активным STIM1 является достаточным для развития гипертрофии. Напротив *in vivo* выключение гена STIM1 предотвращает повышенное давление вызванное гипертрофией. Другие исследования показывают, что нокаут по STIM1 приводит к расширению размера саркоплазматического ретикулума и дезорганизации размера митохондрий и как следствие приводит к развитию кардиомиопатий (Collins et al., 2014). Самые недавние исследования показали, что сайленсинг сердечного STIM1, используя AAV9, предотвращает развитие гипертрофии сердца (Benard et al., 2016). Однако, такие эффекты как в трансфицированных кардиомиоцитах так и с нокаутом по STIM1 не обязательно зависят от SOCE. Независимо от роли в SOCE, он также принимает участие в динамике сокращений кардиомиоцитов с помощью модулирования активности и экспрессии кальциевых каналов Т-типа (Nguyen et al., 2013), увеличивает осцилляции кальция и таким образом вызывает спонтанные генерации потенциала действия в кардиомиоцитах, а его повышенный уровень экспрессии приводит к дезорганизации кальциевых осцилляций (Troupes et al., 2017).

Установлено наличие трех изоформ мембранных белков семейства Orai: Orai1, Orai2, Orai3 в неонатальных и зрелых кардиомиоцитах (Collins et al., 2015; Sobourin et al., 2016), клетках синоартриального узла (Ju et al., 2015) и кардиомиоцитах предсердий (Touchberry et al., 2011). Физиологическая роль Orai1 в миоцитах сердца детально изучена к настоящему времени, однако роль Orai2 и Orai3 остается противоречивой. Показано, что Orai1 является одним из основных участников SOCE и может быть вовлечен в развитие сердечных патологий таких как аритмии, фиброз миокарда и гипертрофию сердца (Ruhle & Trebak 2013). Так в предыдущих исследованиях было показано, что нокаут по Orai1 в значительной степени подавлял тапсигаргин-индуцированный депо-управляемый вход кальция как в неонатальных так и иммортализованных кардиомиоцитах предсердий клнточной линии HL-1 (Voelkers et al., 2010). Недавние исследования показали, что ингибирование Orai1 Synta66 полностью предотвращает альдостерон индуцированную диастолическую перегрузку кальция в неонатальных кардиомиоцитах (Sabourin et al., 2016). В других исследованиях сообщается, что SOCE, опосредованный взаимодействием STIM1 и Orai1, модулирует сердечный ритм с помощью стимуляции пейсмекерных клеток (Zhang et al., 2015), и вероятно может быть вовлечен в иницировании аритмий как с участием кардиомиоцитов желудочков так и предсердных (Wolkowicz et al., 2011; Wang et

al., 2012). Более ранние исследования выявили вовлеченность STIM1/Orai1 опосредованного SOCE в нарушении кальциевого сигналинга, приводящего к развитию гипертрофии сердца, путем изменения эмбриональной генетической программы с помощью NFAT сигналинга. Сайленсинг Orai1 полностью нивелировал фенилэфрин-опосредованную гипертрофию неонатальных кардиомиоцитов, путем активации NFAT сигналинга (Voelkers et al., 2010). Напротив, утрата Orai1 у нокаутных мышей способствует фиброзу и апоптозу кардиомиоцитов, что ускоряет развитие дилатационной кардиомиопатии и сердечной недостаточности (Horton et al., 2014).

Интересно отметить, что Orai3 рекрутирован в комплексе со STIM1/Orai1 при гипертрофии сердца. Показано, что нокаут по Orai1 и Orai3 предотвращает SOCE, а Orai3 также задействован в депо-независимом кальциевом входе через каналы ARC (Arachidonate-Regulated Calcium). Авторы полагают, что Orai3 взаимодействует с Orai1 и STIM1 чтобы сформировать сигнальный комплекс, который необходим для амплификации кальциевого входа в гипертрофированных кардиомиоцитах (Saliba et al., 2015).

Хотя все представленные исследования подтверждают важную роль Orai1 и Orai3 в регуляции сердечной электромеханической активности, но все ещё остаётся неясной точная роль Orai1 и Orai3 в функционировании сердца.

Почти все изоформы семейства TRPC были описаны в кардиомиоцитах (Sabourin et al., 2011; Correll et al., 2015). В ранних исследованиях было показано, что различные изоформы TRPC вовлечены в активацию депо-управляемого входа кальция. Показано, что стимулирование ангиотензином II, фенилэфрином и эндотелином-1 рецепторов сопряженных с G-белками приводит к разрастанию кардиомиоцитов и к увеличению экспрессии маркерных генов гипертрофии. Также показано увеличение тапсигаргин индуцированного SOCE, что коррелирует с увеличенной экспрессией TRPC1. В дальнейшем подавление синтеза TRPC1 с помощью siРНК значительно уменьшало SOCE в преобработанных соответствующими агонистами кардиомиоцитах (Ohba et al., 2007).

Несмотря на попытки установить наличие и роль SOCE в зрелых кардиомиоцитах этот вопрос все ещё остается спекулятивным и актуальным для нашего исследования.

## **1.6. Мышиная модель миодистрофии Дюшенна**

Любое исследование начинается с выбора модельного объекта, который определяется из поставленных целей и задач эксперимента. Как правило, основными критериями для выбора модельного объекта является его доступность, удобство в постановке эксперимента и максимальная филогенетическая близость к человеку, чтобы верно экстраполировать полученные результаты в случае изучения патологий человека. Согласно принципам биологической специфичности и универсальности исследователь определяет общие закономерности, которые можно перенести на более широкую группу организмов и устанавливает индивидуальные особенности, характерные только для выбранного объекта.

Среди модельных животных мыши являются одним из оптимальных вариантов. Во-первых, они просты в содержании и достаточно быстро размножаются по сравнению с другими млекопитающими. Во-вторых, мыши филогенетически намного ближе к человеку, нежели различные модельные объекты беспозвоночных, например, дрозофила, с другой стороны не требуют жесткого этического контроля по сравнению, например, с обезьянами. В-третьих, к настоящему времени разработано множество модельных линий мышей с различными патологиями, что очень удобно для исследования различных заболеваний у человека.

Наиболее удачной моделью для изучения миодистрофии Дюшенна служит мышиная модель — линия mdx с нокаутом по гену дистрофина. Однако существуют



проблемы связанные со спецификой протекания заболевания у мышей. Показано, что развитие миодистрофии у мышей происходит медленно и не приводит к летальному исходу, в отличие от человека (Sacco et al., 2010).

Миодистрофия Дюшенна является наследственным заболеванием и связана с мутациями в гене дистрофина, в результате чего в клетках отсутствует белок дистрофин. Дистрофин является одним из основных белков цитоскелета клетки, который необходим для стабильности мембраны, нормального функционирования мембранных и цитозольных белков связанных с цитоскелетом. Отсутствие дистрофина или нарушение его синтеза может приводить к нарушению кластеризации мембранных рецепторов, дезорганизации белков скэффолда. Как результат, в клетке нарушается колокализованное взаимодействие рецепторов, ионных каналов, что приводит к нарушению гомеостаза и гибели клетки. В отсутствие дистрофина показана быстрая гибель клеток в особенности миоцитов скелетной и сердечной мускулатуры. Такие клетки обладают повышенной ломкостью сарколеммы, что даже при значительных нагрузках приводит к гибели клеток и развитию серьёзной патологии. Пациенты с миодистрофией Дюшенна страдают от прогрессирующей утраты мышечных функций, приводящих к параличу и смерти, начиная с первых лет жизни (Sacco et al., 2010).

На сегодняшний день молекулярные механизмы, лежащие в основе патогенеза данного заболевания, остаются неизвестными, а предлагаемое лечение является симптоматическим. Отмечается нарушение электрогенеза в мышечных клетках, что приводит к нарушению работы потенциала-управляемых каналов и сократимости мышечных клеток (Sacco et al., 2010).

Как известно ионы кальция являются важнейшим участником сопряжения возбуждения и сокращения в сердце, таким образом, можно ожидать, что в патогенезе сердечно-сосудистой системы могут быть задействованы потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа из-за аномального функционирования которых происходит развитие аритмий, а при их инактивации — сглаживание симптомов. Отмечается развитие аритмий у больных с различными миопатиями (Onopiuk et al., 2015).

Однако помимо дисфункции потенциал-управляемых каналов при миопатиях, показано, что развитие дистрофии мышечных клеток связано с нарушением белков депо-управляемого входа кальция. Например, тяжёлый комбинированный иммунодефицит ассоциирован с мутациями белков STIM1 и Orai1 и характеризуется уменьшением SOCE в миоцитах в случае патологии и атрофией мышечной ткани (Lacruz & Feske, 2015). Что касается миодистрофии Дюшенна, то на мышинной модели (mdx) показано, повреждение кальцийсвязывающих белков в том числе и STIM1 (Onopiuk et al., 2015). Таким образом, депо-управляемый вход кальция может быть задействован в патогенезе миодистрофии Дюшенна и может использоваться в качестве потенциальной мишени для новых фармакологических препаратов при терапии миодистрофии Дюшенна.

В данной работе была поставлена не только задача электрофизиологическими методами подтвердить наличие депо-управляемого входа кальция в зрелых вентрикулярных кардиомиоцитах, полученных из мышей дикого типа, но и постараться выяснить, какие изменения кальциевого сигналинга происходят в кардиомиоцитах, полученных от мышей, моделирующих миодистрофию Дюшенна.



## 2. Материалы и методы

### 2.1 Получение первичной культуры желудочковых кардиомиоцитов взрослой мыши (*Mus musculus*)

В данной работе использовалась первичная культура желудочковых кардиомиоцитов взрослой мыши (*Mus musculus*) дикого типа и mdx-мышей с мутацией в гене белка цитоскелета — дистрофина, которые являются лабораторной моделью миодистрофии Дюшенна. Мыши, моделирующие миодистрофию Дюшенна, были любезно предоставлены сотрудником Института цитологии РАН Михайловым В.М.

Выделение клеток производили в растворе Тирода следующего состава: 135 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.33 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM глюкозы, 10 mM HEPES, без кальция, pH 7.35-7.4. Начинали работу с подготовки системы Лангердорфа и необходимого инструментария: хирургический и анатомический пинцеты для захвата и удержания тканей, пара технических пинцетов для канюляции, ножницы и лигатура для перевязки аорты. Установка состоит из двух холодильников Либиха, куда заливается по 50 мл раствора Тирода в каждый. Через внешний контур холодильников постоянно циркулирует вода с постоянной температурой 39.5°C. Вода прогоняется через внешний контур холодильников с помощью компрессора и нагревает раствор Тирода. Заливали раствор Тирода в чашки для канюлирования, заполняли шприц и надевали канюлю, избегаясь от образовавшихся пузырей. За две минуты до умерщвления мыши вкалывали 0.5 ml гепарина, для предотвращения образования тромбов. Умерщвление мыши проводили с помощью цервикальной дислокации. После наступления смерти животного вскрывали грудную клетку и извлекали сердце. Проводили канюляцию сердца через аорту в холодном растворе Тирода. После канюлирования, начинали перфузию сердца раствором Тирода в течение 5 минут для удаления остатков крови из сердца. Далее перфузию проводили с раствором 0.05 mM либеразы (LIBTH-RO ROCHE Liberase™ TH Research Grade, Roche, Германия), ферментативной смесью из коллагеназ и термолизина для разрушения межклеточного вещества и диссоциации клеток, в течение 15 минут. Для mdx-мышей перфузию проводили с 0.1 mM раствором либеразы в течение 10 минут. В дальнейшем сердце измельчали с помощью препаровочных ножниц, полученную суспензию отфильтровывали от остатков неразделившихся тканей через нейлоновый фильтр. Для лучшего осаждения клеток использовали заранее подогретый до 37°C 5% раствор БСА (бычий сывороточный альбумин) в Тироде. После выделения клетки использовали в электрофизиологических исследованиях или для приготовления лизатов.

### 2.2 Получение лизатов желудочковых кардиомиоцитов взрослой мыши (*Mus musculus*)

После выделения клеток отбирали супернатант и добавляли к осадку клеток лизирующий буфер следующего состава: 20 mM трис-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Тритон X-100, 2 mM EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), 0.2 mM PMSF (фенилметаносульфонилфторид) ингибитор сериновых протеаз и 1 таблетку на 100 мл лизирующего буфера коммерческого коктейля ингибиторов протеаз (PIC, Hoffmann-La Roche AG, Германия). Клетки ставили на 10 минут при температуре +4°C, периодически перемешивая. После этого раствор гомогенизировали с помощью шприца и переносили в предворительно охлажденный эппендорф и центрифугировали 10 минут на скорости 14000 g при +4°C. Супернатант отбирали в отдельный эппендорф и добавляли к нему четырехкратный Лэмли буфер следующего состава: 60 mM трис-HCl pH 6.8, 8% SDS, 40% глицерола, 20% свежеприготовленного  $\beta$ -меркаптоэтанола и 0.01% индикатора бромфеноловый синий для визуализации проб при последующем электрофорезе, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 5 минут при температуре плюс 99°C. Далее центрифугировали 5 минут на скорости 14000 g при +4°C и ставили на хранение при температуре минус 20 °C до востребования лизатов.

### 2.3 Электорофорез и иммуноблоттинг

Электрофоретическое разделение белков проводили в денатурирующих условиях в системе двух гелей: концентрирующего и разделяющего по модифицированной методике Лэмли (Laemmli U.K., 1970) в 8%-ном концентрирующем и 5%-ном разделяющем полиакриламидном геле. Разделяющий гель: 8% акриламида, 375 мМ Трис-НCl pH 8.8, 0.1% SDS и полимеризующие агенты: 0.1% ПСА (персульфат аммония), 0,08% TEMED (N,N,N,N-тетраметилендиамин). Концентрирующий гель: 5% акриламида, 133 мМ Трис-НCl pH 6.7, 0.1% SDS и полимеризующие агенты: 0.1% ПСА, 0,05% TEMED. Использовали камеры для вертикального электрофореза (Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell, BioRad). На протяжении 15 минут при силе тока 25 мА происходило концентрирование проб и в течении 40 минут при силе тока 50 мА разделение белков. Разделение проводили в однократном трис-глициновом буфере (TGB). TGB 5x, pH 8.3: 125 мМ триса, 1.25 М глицина, 0.5% SDS.

Белки переносили из полиакриламидного геля на PVDF мембрану (Sequi-Blot PVDF Membrane 1620184, BioRad) с помощью прибора для влажного электропереноса (Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell, BioRad) в трансфер буфере. Трансфер буфер pH 8.3: 48 мМ трис, 39 мМ глицин, 5% метанол. Предварительно PVDF-мембрану помещали в чистый метанол на 3 с, затем на 2-4 минуты в дистиллированную воду и на 15 минут в трансфер буфер. Перенос проводили в условиях: 250 мА, 25 мВ, 100-120 Вт на 12ч. (в течение ночи). Качество разделения белков оценивали по окрашиванию нанесённых белковых проб в ПААГ красителем кумасси G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) до и после влажного электропереноса белков на мембрану. Использовали раствор кумасси следующего состава: 0.22% красителя кумасси, 10% уксусной кислоты и 25% этанола. Отмывку связавшегося с гелем красителя для удаления фоновой окраски проводили в 5% уксусной кислоте, два раза доводя до кипения в микроволновой печи.

Контроль переноса белков на PVDF-мембрану осуществляли с помощью обратимого окрашивания органическим красителем Понсо-S red (Ponceau-S red), что не препятствует дальнейшей иммунодетекции.

После переноса белков, мембрану инкубировали в течение часа в 5% растворе сухого обезжиренного молока, для исключения возможного неспецифического связывания антител с мембраной. Выявление белков проводили с использованием поликлональных первых антител продуцированных в кролике против Orai1 (O8264, Sigma, США) и Orai3 (SAB2900755, Sigma, США) в разведении, 1:250 (Orai3) и 1:1000 (Orai1) в TBST (Tris Buffered Saline T-Tween) с 5% БСА для минимизации неспецифического связывания антител и 0.1% азидом натрия, для подавления контаминации и лучшего сохранения антител. В качестве вторых антител брали антитела против константной части иммуноглобулинов G (IgG) кролика, продуцированные в козе (1 : 30000), разведенные в 5% сухом обезжиренном молоке, конъюгированные с пероксидазой хрена (A0545, Sigma, США). Мембраны с первыми антителами ставили инкубироваться на ночь в холодильник при температуре +4°C. Вторые антитела инкубировали в течении часа при комнатной температуре. Для отмывки от антител использовали однократный TBST (Tris Buffered Saline T-Tween). TBST pH 9.5: 100 мМ триса, 100 мМ хлорида натрия, 0.05% Твина. Для нормирования содержания белков в пробах мембраны инкубировали в течении часа при комнатной температуре с антителами к  $\alpha$ -тубулину, используя моноклональные антитела (T9026-2ML, Sigma, США) в разведении 1:1000, в TBST, а после со вторыми антителами конъюгированные с пероксидазой хрена (A0545, Sigma, США).

Для хемилюминесцентной детекции (ECL) использовали раствор, содержащий 1.5 М Трис-НCl pH 8.5, 12.5 мМ люминола, 2 мМ кумаровой кислоты и 40% перекись водорода, а так же набор SuperSignal™ WestFemtoMaximumSensitivitySubstrate

(Thermofisherscientific). Проявление проводили на приборе ChemiDoc (ChemiDoc™ Touch Imaging System Bio-Rad, США) в режиме хемилюминесценции. Содержание белка сравнивали с помощью программы Image Lab, оценивая хемилюминесценцию, путем измерения интенсивности и площади детектируемых полос. Эксперименты повторяли 3 раза, используя различные лизаты клеток.

## 2.4 Электрофизиологические исследования

Для регистрации ионных токов использовали метод локальной фиксации потенциала на мембране в режиме whole-cell (от целой клетки) по классической методике (Hamill & Sakmann, 1981). Для визуализации клеток в проходящем свете использовали инвертированный микроскоп (Axiovert) на антивибрационной подушке. Клетки помещались в камеру с изотоническим по отношению к клеточной среде раствором тетраэтиламмония хлорида и хепеса осмолярностью 290-300 мОсм/кг и pH=7.4. Для контроля внутриклеточного раствора использовали стеклянные микроэлектродные пипетки, заполняя их раствором следующего состава: 125 mM CsCl, 10 mM EGTA-Cs, 10 mM Hepes-Cs, 5.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM Mg-ATP, pH 7.3. Для получения гигаомного контакта между стеклянной микроэлектродной пипеткой и клеткой, пипетку наводили на мембрану клетки до ее касания, далее подавали электрический импульс для прорыва мембраны. С помощью автоматической кузницы Sutter P97 вытягивали пипетки. Использовали тонкие микрофиламенты из боросиликатного стекла (внутренний d=1.1 мм, внешний: 1.5 мм). Вытягивание осуществляли в несколько этапов, что позволяет получить требуемую форму кончика пипетки и диаметр ее отверстия. Сопротивление микроэлектродов составляло 3–5 МОм. До записи трансмембранных ионных токов, компенсировали емкостное сопротивление. Измерения выполняли с помощью усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Последовательное сопротивление не компенсировали. Усиленный и предварительно отфильтрованный встроенным в усилитель двухполосным фильтром Бесселя (частота среза 500 Гц) сигнал оцифровывали на частоте 5000 Гц с помощью платы АЦП L305 («L-Card», Россия). При записях интегральных токов клетки потенциал мембраны поддерживали при –70 мВ. Периодически (каждые 5 с) потенциал на мембране изменяли до –100 мВ (на 30 мс), а затем постепенно (с постоянной скоростью 0.2 мВ/мс) его величину изменяли до +60 мВ. Шаг измерения составлял 0.5 мВ. Записанные токи нормировали относительно емкости клетки (80–120 пФ). Записи, полученные до активации исследуемых токов, использовали в качестве матрицы для вычитания тока утечки и тока через другие каналы. Для записи токов использовали программу WinWCPV5.3.4. Обработку записанных данных проводили в программе Clampfit 9.2. Статистическую обработку и построение графиков проводили с помощью пакета программ Origin фирмы OriginLab.

## 5. Растворы для электрофизиологических измерений

Для регистрации токов пипеточный раствор содержал: 125 mM CsCl, 10 mM EGTA-Cs, 10 mM Hepes-Cs, 5.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM Mg-ATP, pH 7.3. Внеклеточный раствор содержал: 140 mM тетраэтиламмонияхлорида, 10 mM Hepes-Cs, 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.3. и 10 мкМ нифедипина, для блокирования потенциала-управляемых кальциевых каналов. Для активации депо-управляемого входа кальция во внеклеточный раствор добавляли 2 мкМ тапсигаргина, блокатора кальциевой АТФ-азы SERCA и 50 mM кофеина, активатора IP<sub>3</sub> рецептора. После развития тока производили смену раствора с добавлением селективного блокатора депо-управляемого входа кальция 50 мкМ 2-APB.

### 3. Результаты и обсуждение

Целью нашей работы было исследование депо-управляемого входа кальция в кардиомиоцитах желудочков сердца взрослой мыши и его возможной роли в развитии миодистрофий у модельной линии мышей — mdx.

В работе использовались две линии мышей: дикого типа и линии mdx с нокаутом по гену дистрофина. В качестве объекта исследования выступали клетки первичной культуры кардиомиоцитов желудочков сердца взрослой мыши. Часть полученных клеток использовалась для приготовления лизатов и последующего анализа экспрессионного паттерна белков, отвечающих за депо-управляемый вход кальция. Другая часть клеток использовалась для проведения электрофизиологических исследований: измерения токов через потенциал-управляемые кальциевые каналы и депо-управляемые каналы.

#### 3.1 Оптимизация условий для выделения культуры кардиомиоцитов желудочков сердца взрослой мыши

На первом этапе исследования проводился подбор оптимальных условий для получения первичной культуры кардиомиоцитов желудочков сердца мыши. Характерным признаком успешного выделения является преобладание цилиндрических клеток без видимых деформаций мембраны. Получение хорошей культуры очень важно для дальнейших исследований, как для электрофизиологических опытов, так и получения клеточных лизатов. Стоит отметить, что количественное содержание белка в пробе коррелирует с качеством полученных клеток, а проведение электрофизиологических исследований невозможно без хорошей культуры клеток.

Для сборки установки были заказаны два холодильника Либиха со следующими параметрами: длина - 700 мм; диаметр внешней трубки - 45 мм; диаметр внутренней трубки - 15 мм. Параметры были подобраны для создания оптимального гидростатического давления при перфузии сердца и для обеспечения быстрого нагрева раствора во внутренней трубке за счет циркуляции жидкости во внешнем контуре. Было выявлено несколько критических моментов в методике для выделения полноценных клеток. Во-первых, время на препарирование мыши и канюлирование сердца. Данный временной интервал не должен превышать десяти минут, в противном случае выживаемость клеток сильно снижается. Во-вторых, избегание образования пузырей, которые могут приводить к эмболии сердца и гибели клеток. Перфузия должна идти равноускоренно, по мере размягчения тканей сердца под воздействием фермента. Для эффективного удаления крови из сердца за 5-10 минут до цервикальной дислокации мышам вкалывали 0.5 мл гепарина, что препятствует свертыванию крови и, соответственно, образованию тромбов. Еще один критический момент заключался в поддержании оптимальной температуры перфузирующего раствора. Для обеспечения температуры раствора, перфузирующего сердце, на уровне близком к температуре тела — 37°C, температуру воды во внешнем нагревающем контуре поддерживали на уровне 39.5 °C.

Для выделения первичной культуры кардиомиоцитов использовался коммерческий ферментативный комплекс — Либераза (Roche, Германия). Выбор данного ферментативного комплекса неслучаен. Либераза отлично себя зарекомендовала при выделении островков Лангерганца из поджелудочной железы, богатой соединительной тканью. Основным компонентом межклеточного вещества является коллаген, глицин богатый белок. Таким образом состав фермента подобран с учетом специфики сайтов расщепления субстратов, из которых преобладают G/G, P/G и L/G. Либеразу растворяли в солевом растворе Тирода в концентрации 0.05 мМ. pH раствора Тирода (7.3) удовлетворял оптимальному диапазону pH для работы Либеразы (6.8-8.0).

Подобранные для адаптации протокола выделения условия позволили нам стабильно получать качественную первичную культуру кардиомиоцитов с содержанием

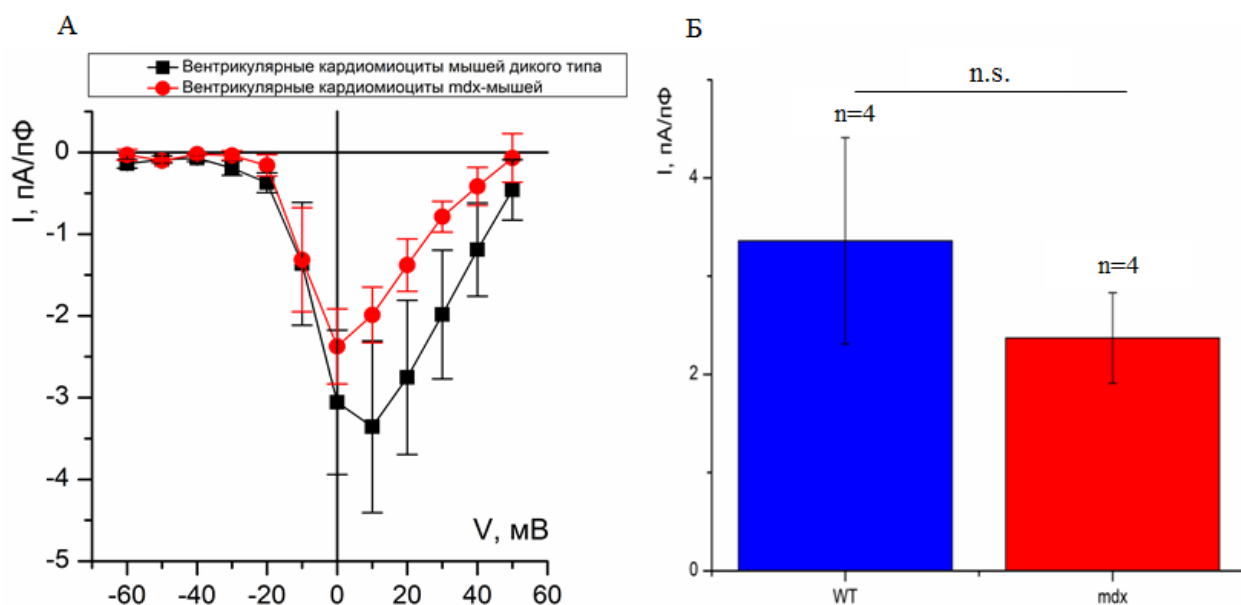
визуально живых клеток в культуре не менее 50%.

### **3.2 Токи кальция через потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа ( $\text{Ca}_v1.2$ )**

В кардиомиоцитах преобладают потенциал-управляемые кальциевые каналы L и T типа, которые отличаются своими биофизическими характеристиками. Установлено, что каналы T типа экспрессируются в эмбриональный период, в кардиомиоцитах синоатриального и атриовентрикулярного узла, а также в клетках Пуркинье, где участвуют в пейсмекерной активности (Hille, 2001). Они активируются при незначительной деполяризации мембраны и быстро инактивируются. Считается, что они принимают участие в регуляции пролиферации и росте клеток в эмбриональном периоде, а их вклад в сократительную функцию сердца минимален (Hille, 2001). Что касается каналов L-типа, то они главным образом локализованы в кардиомиоцитах желудочков и обеспечивают сократительную функцию сердца. Данные каналы активируются при значительной деполяризации мембраны (более  $-10$  мВ), имеют достаточно большую проводимость ( $25$  пСм) и медленно инактивируются за что и получили свое название (Hille, 2001). Данная характеристика позволяет каналам L-типа обеспечивать фазу-плато потенциала действия кардиомиоцитов и запускать сокращение клетки. Таким образом, по активности кальциевых каналов L-типа можно оценить функциональность кардиомиоцитов.

В нашей работе электрофизиологические исследования начинали с измерения кальциевых токов через потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа, чтобы подтвердить функциональную электровозбудимость полученной культуры кардиомиоцитов.

Активация каналов происходила при потенциале на мембране  $-30$  мВ. Максимум амплитуды тока достигался при потенциале от  $0$  до  $+10$  мВ и составлял  $3,36 \pm 1,05$  и  $-2,37 \pm 0,46$  пА/пФ для контрольных кардиомиоцитов и для mdx-кардиомиоцитов соответственно (рис.3.1А,Б) При положительных значениях потенциала происходит медленная инактивация каналов. Полученные вольт-амперные характеристики соответствуют типовым характеристикам для потенциал управляемых кальциевых каналов L-типа, а именно каналов  $\text{Ca}_v1.2$ . После регистрации кальциевого тока, осуществляли его блокирование с использованием селективного блокатора потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа —  $10$  мкМ нифедипина. Аппликация  $10$  мкМ нифедипина приводила к практически полному подавлению амплитуды потенциал-управляемых кальциевых токов, как для контрольных кардиомиоцитов, так и для mdx-кардиомиоцитов.



**Рис.3.1 Активность потенциал-управляемых кальциевых каналов  $Ca_v1.2$  в зрелых вентрикулярных кардиомиоцитах мыши (А,Б).** (А) Средние вольт-амперные характеристики потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа, соответствующие каналам  $Ca_v1.2$ , в зрелых вентрикулярных кардиомиоцитах, полученных из мышей дикого типа (черная линия) и мышей mdx (красная линия). (Б) Средние значения амплитуды максимальных токов через потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Количество экспериментов указано над соответствующими столбиками. Данные статистически неразличимы ( $p > 0.05$ ).

Полученные результаты показывают, что различия в токах кальция через потенциал-управляемые каналы L-типа в кардиомиоцитах, полученных из мышей дикого типа и mdx-мышей, являются статистически недостоверными ( $p > 0.05$ ) (рис.3.1А,Б). Тем не менее, во многих работах, опубликованных ранее, отмечалось увеличение входа кальция через каналы L-типа в mdx-специфичных кардиомиоцитах (Koenig et al., 2014). Наши данные противоречили этим исследованиям. Однако совсем недавно вышла статья, где показано, что амплитуды кальциевых токов через потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа в вентрикулярных кардиомиоцитах у мышей с миодистрофией Дюшенна значительно увеличены по сравнению с мышами дикого типа лишь только в случаях использования культуры постнатальных кардиомиоцитов либо при выделении культуры клеток из молодых мышей (до 25 недель) (Rubi et al., 2018). Выделение же культуры кардиомиоцитов из более взрослых мышей (как это и происходило в нашем случае) не приводило к увеличению амплитуды кальциевого входа через каналы L-типа. Таким образом, мы можем предварительно заключить, что наши предварительные результаты подтверждают уже опубликованные экспериментальные данные. Для более строгого вывода необходим существенно больший объем экспериментов, позволяющий снизить ошибку и повысить уровень достоверности полученных результатов.

Также необходимо отметить, что полученные клетки способны адекватно отвечать на изменение потенциала на мембране и могут быть использованы для дальнейшей исследований, в том числе для регистрации депо-управляемого кальциевого входа.

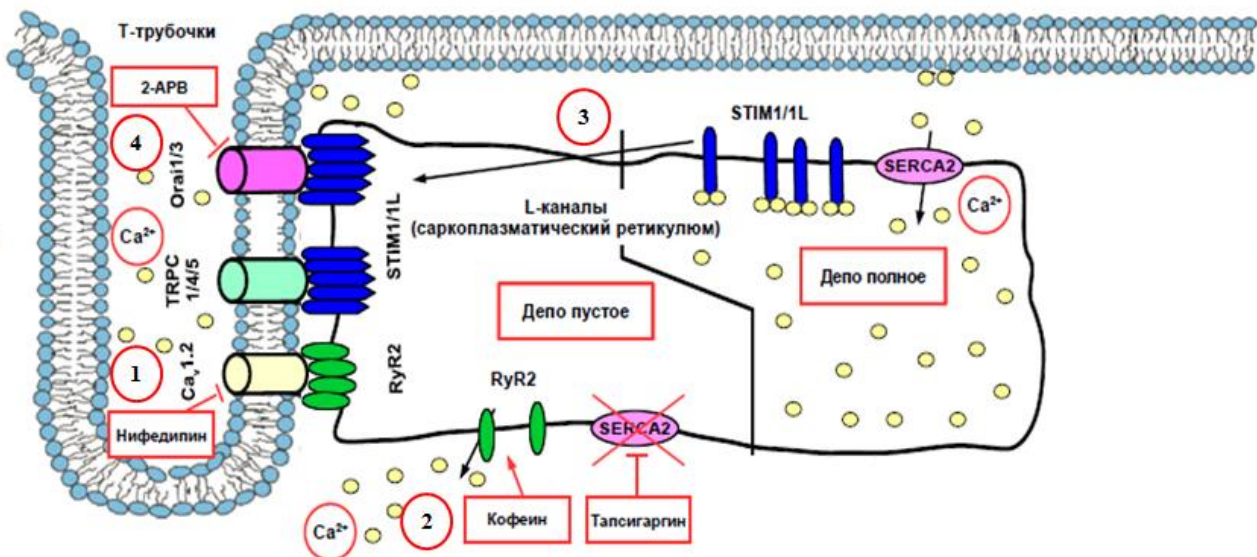
### 3.3 Депо-управляемые токи, соответствующие CRAC-каналам ( $I_{CRAC}$ )

Депо-управляемый вход кальция — это процесс поступления ионов кальция из внеклеточного пространства в цитозоль в ответ на понижение концентрации ионов кальция во внутриклеточных кальциевых депо (эндо/саркоплазматический ретикулум). Наличие депо-управляемого входа кальция и его вовлеченность в важнейшие физиологические функции клетки, такие, например, как пролиферация и апоптоз, было

показано и на на электроневоозбудимых клетках (Poggioly & Putney, 1981) и в нейронах (Bourgon et al., 2005). Нарушения депо-управляемого входа кальция отмечались в патогенезе различных заболеваний, в том числе нейродегенеративных (Agnese Secondo et al., 2018), диабете (Chaudhari & Rong, 2015), аллергиях (Lacruz & Feske, 2015). Тем не менее, в настоящее время в литературе практически отсутствуют данные о депо-управляемом входе кальция в кардиомиоцитах.

С помощью метода локальной фиксации потенциала (patch clamp) в условиях отведения от целой клетки (whole cell) (Hamill & Sakmann, 1981) мы регистрировали интегральные ионные токи. В соответствии с законом Ома, если напряжение на мембране постоянно, изменения тока однозначно связаны с изменениями проводимости. В свою очередь, мы можем фиксировать мембранный потенциал на разном уровне и измерять возникающие при этом токи. Запись ионных токов осуществлялась при изменении мембранного потенциала от -100 до +60 мВ. Все ионные токи нормировались на емкость каждой клетки, которая составляла от 80 до 120 пФ. Токи, зарегистрированные до активации депо-управляемого входа кальция, использовались в качестве матрицы для вычитания.

Схема проведения исследования представлена на рис.3.2 и включает в себя следующие этапы: блокирование потенциал управляемых токов, активация депо-управляемых токов и блокирование депо-управляемых токов. При заполненном кальцием саркоплазматическом ретикулуме белки STIM находятся в связанном с кальцием состоянии. В ходе опустошения депо в результате потери связи с кальцием происходит изменение их конформации, агрегация и перемещение в область сарколеммы сближенной плазмалеммой Т-трубочек и взаимодействие с депо-управляемыми каналами, в результате чего активируется депо-управляемый вход кальция. Выход кальция из депо осуществляется через ионотропный рианодиновый рецептор, а обратная загрузка осуществляется с помощью кальциевой АТФ-азы саркоплазматического ретикулума — SERCA.

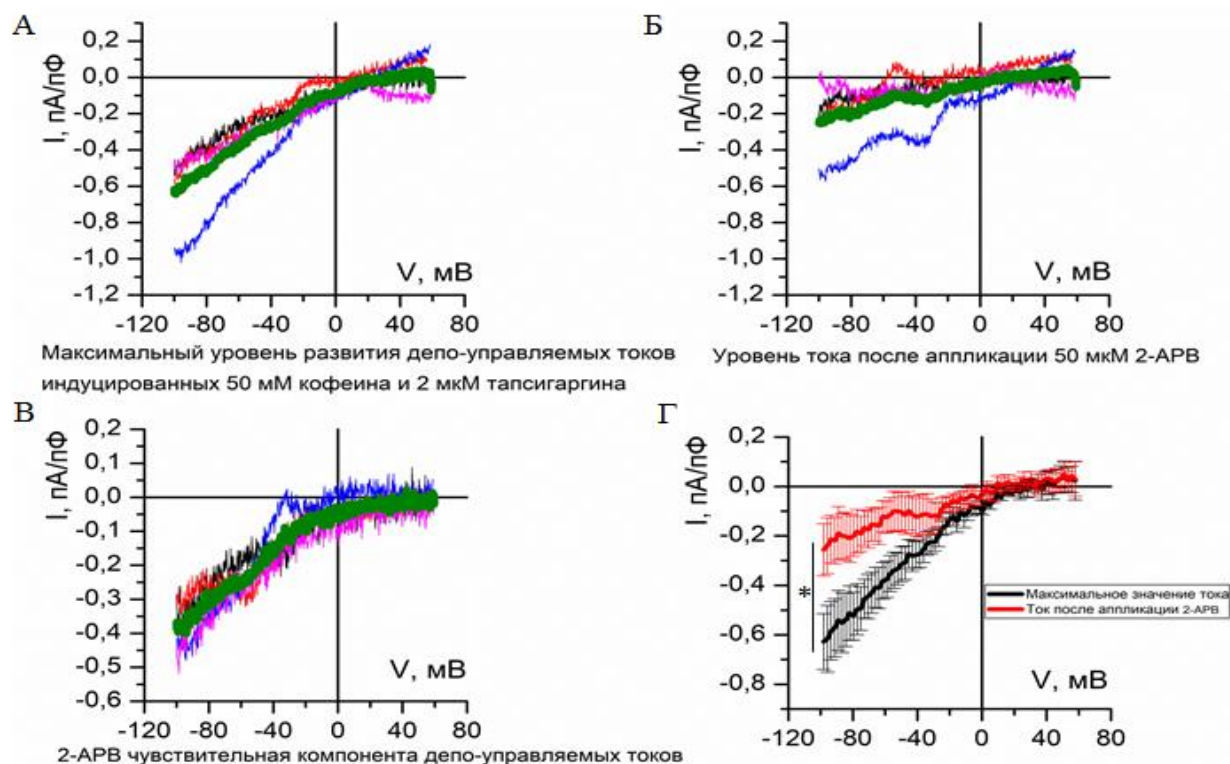


**Рис.3.2** Схема электрофизиологических исследований. Продемонстрированы основные участники депо-управляемого входа кальция в кардиомиоцитах. Потенциал-управляемые кальциевые каналы  $Ca_v1.2$ , депо-управляемые каналы, образованные белками TRPC и Orai1 локализованы в системе Т-трубочек плазматической мембраны кардиомиоцитов. Белки STIM, рианодиновые рецепторы, SERCA локализованы в мембране саркоплазматического ретикулума. Красными стрелками показаны действия агонистов и блокаторов, подаваемых в ходе эксперимента: под цифрой 1 — блокирование нифедипином



потенциал-управляемых каналов  $Ca_v1.2$ ; под цифрой 2 — индуцирование выброса кальция из депо с помощью блокатора  $SERCA$  ( $Ca^{2+}$  АТФ-аза эндоплазматического ретикулума) тапсигаргина и активации  $RyR2$  (рианодинотворный рецептор) кофеином; под цифрой 3 — процесс активации депо-управляемых каналов. Когда депо заполнено, белки  $STIM$  находятся в связанном с кальцием состоянии. В случае опустошения депо белки  $STIM$  теряют связь с кальцием, происходит их кластеризация и взаимодействие с белками плазматической мембраны, что приводит к активации депо-управляемых каналов. 4 — блокирование депо-управляемых каналов 2-APB (2-аминоэтоксидифенилборат).

Для измерения депо-управляемых токов, первоначально проводили блокирование потенциал-управляемых кальциевых каналов путем добавления во внеклеточный раствор 10 мкМ селективного блокатора потенциально-управляемых кальциевых каналов — нифедипина. После записи в течении двух минут, внеклеточный раствор меняли на раствор содержащий 10 мМ кофеина, активатора рианодинотворного рецептора, способствующего опустошению кальциевого депо — саркоплазматического ретикулума, и 2 мкМ тапсигаргина, селективного блокатора кальцевой АТФ-азы  $SERCA$ , что блокировало обратную закачку кальция в депо. В результате опустошения депо активировались токи кальция через депо-управляемые каналы. Через 1 минуту после индукции опустошения депо внеклеточный раствор заменяли на раствор содержащий 2 мкМ тапсигаргина и наблюдали развитие тока, максимальная амплитуда которого составила  $0.52 \pm 0.09$  пА/пФ (рис. 3.3 А,Д) при потенциале на мембране —минус 80 мВ. После того как уровень тока достигал максимума и выходил на плато, подавали селективный блокатор депо-управляемых каналов — 2-APB и наблюдали уменьшение тока до уровня  $0.20 \pm 0.09$  пА/пФ (рис. 3.3 Б,Д). Таким образом, мы зарегистрировали 2-APB чувствительную компоненту депо-управляемых токов, которая составила  $0.32 \pm 0.03$  пА/пФ



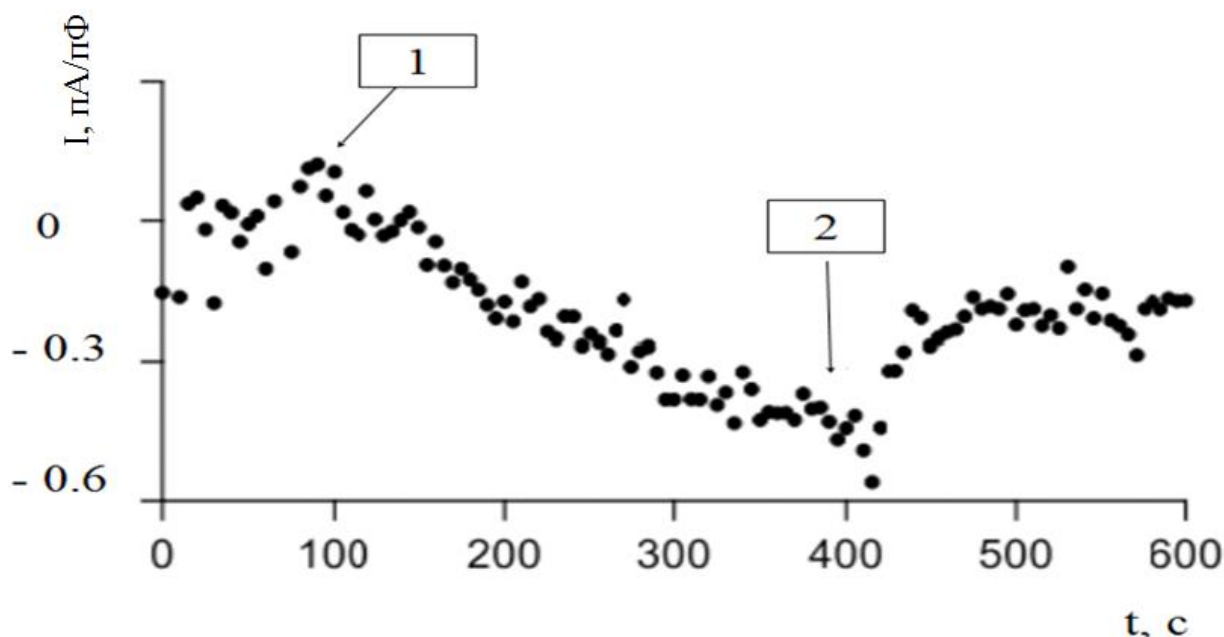
(рис. 3.3 В).

**Рис.3.3** Депо-управляемые токи кальция в кардиомиоцитах желудочков сердца взрослой мыши (А-Г). Вольт-амперные характеристики токов, индуцированных аппликацией 10 мМ кофеина и 2 мкМ тапсигаргина, в момент достижения токами максимальной амплитуды (А), после блокирования токов 50 мкМ 2-АРВ (Б), токов,



обладающих чувствительностью к 50 мкМ 2-APB (С). Линиями показаны вольт-амперные характеристики отдельных экспериментов. Зелёными жирными линиями показано среднее значение токов. (Г) средние значения токов, индуцированных аппликацией 10 мМ кофеина и 2 мкМ тапсигаргина, в момент достижения токами максимальной амплитуды (черная линия), после блокирования токов 50 мкМ 2-APB (красная линия). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* показана достоверность различия амплитуд токов при потенциале - 80 мВ ( $p < 0.05$ ).

Типичное изменение мембранного тока при потенциале минус 80 мВ представлено на рисунке 3.4.



**Рис.3.4** Депо-управляемый вход кальция в кардиомиоцитах. Изменение трансмембранного тока, индуцированного аппликацией 10 мМ кофеина и 2 мкМ тапсигаргина, во времени. Цифрой 1 показан момент аппликации кофеина и тапсигаргина. Цифрой 2 показан момент аппликации 50 мкМ блокатора 2-APB. Представлены данные репрезентативного эксперимента.

Полученные нами вольт-амперные характеристики депо-управляемого тока (рис.3.3 С) характеризуются входящим выпрямлением, то есть способностью канала лучше проводить входящий ток катионов, нежели исходящий. При этом при положительных потенциалах ток практически прекращается. Данная форма кривой характерна для ранее описанных широко известных депо-управляемых CRAC-каналов, образованных белками Orai. Однако существуют и другие депо-управляемые каналы, например, образованные белками семейства TRPC, которые имеют отличную от CRAC-каналов вольт-амперную характеристику. В частности, они отличаются меньшей селективностью к ионам кальция, более высокой проводимостью и относительно линейной вольт-амперной характеристикой. В наших экспериментах удалось показать  $I_{CRAC}$ .

Для клеток сердечной мышцы важность точной кальциевой регуляции определяется тем, что именно ионы кальция играют ключевую роль в выполнении кардиомиоцитами своей основной функции – сердечных сокращений. Спонтанное увеличение концентрации свободных ионов кальция в цитозоле ведет к активации миофиламентов и неконтролируемому сокращению клетки. Нарушение кальциевого

гомеостаза в кардиомиоцитах может приводить к появлению неконтролируемых сердечных сокращений и, таким образом, развитию аритмий.

Депо-управляемый вход кальция является одним из наиболее общих типов притока кальция из внеклеточной среды в цитозоль. Тем не менее, его важность для функционирования нормальных зрелых кардиомиоцитов остается дискуссионной. В самом деле, кардиомиоциты – клетки, отвечающие за сердечные сокращения, для сопряжения между возбуждением мембраны и сокращением клетки используют вход кальция через потенциал-управляемые каналы L-типа и сопутствующий ему выброс кальция из саркоплазматический ретикулум через рецептор рианоина. Затем происходит удаление кальция из цитозоля и закачка его обратно в ретикулум. Данные события являются быстрыми, способными обеспечить цикл сердечных сокращений и релаксаций, необходимый для нормального кровообращения. Депо-управляемый вход кальция – гораздо более медленный процесс. Для его развития требуется время на 2 порядка превышающее период сердечных сокращений. Таким образом, роль депо-управляемого входа кальция в гомеостазе ионов кальция в кардиомиоцитах является неочевидной. Спекулятивно можно предположить, что депо-управляемый вход кальция является конститутивным и необходим для создания постоянного потока кальция в цитозоль, призванного компенсировать потерю кальция клетками вследствие работы АТФаз плазматической мембраны. Другая возможность заключается в том, что амплитуда депо-управляемого входа кальция сравнительно невелика и, возможно, используется кардиомиоцитами для осуществления локального кальциевого сигналинга, не связанного с сократительным аппаратом клетки, например, для активации каких-либо кальций-зависимых транскрипционных факторов. Также обсуждалась гипотеза, что депо-управляемый вход кальция отсутствует в нормальных зрелых кардиомиоцитах, появляясь в различных патологиях, дестабилизируя кальциевый гомеостазис, и внося, таким образом, вклад в развитие аритмий.

Нам удалось впервые с помощью электрофизиологических методов зарегистрировать CRAC-подобные токи кальция в зрелых вентрикулярных кардиомиоцитах мыши дикого типа (рис.3.3С). Данные токи вызывались опустошением внутриклеточных кальциевых депо 10 мМ кофеина и 2 мкМ тапсигаргина и были чувствительны к известному блокатору CRAC каналов – 2-APB (рис. 3.3, 3.4). Тем не менее, необходимо отметить, что подобные токи нам удавалось зарегистрировать лишь в 10-15% экспериментов. Данная низкая частота может быть связана с «Кальциевым парадоксом», проявляющимся в том, что те клетки, которые способны продемонстрировать ответ, настолько чувствительны к кальцию, что погибают еще в процессе получения культуры либо при переводе клеток в кальций-содержащий раствор. Также можно предположить, что низкая частота встречаемости депо-управляемых токов обусловлена гетерогенностью выделяемой культуры клеток, и не все вентрикулярные кардиомиоциты в зрелом состоянии способны включать депо-управляемый кальциевый ответ.

### **3.4 Экспрессия белков аппарата депо-управляемого входа кальция**

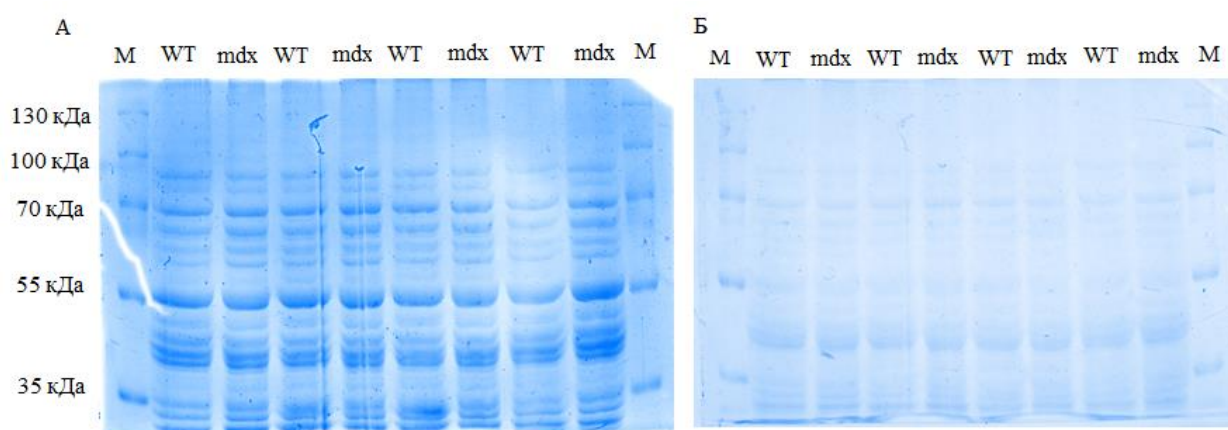
Основными белками аппарата депо-управляемого входа кальция являются белки семейств STIM, Orai, TRPC. Orai и TRPC (прежде всего, белки Orai1, Orai3, TRPC1, TRPC3) являются каналообразующими белками и формируют депо-управляемые каналы в плазматической мембране. Белки STIM1/1L и STIM2 являются кальциевыми сенсорами. STIM1,2 в ответ на опустошение депо меняют свою конформацию, кластеризуются и взаимодействуя с депо-управляемыми каналами активируют депо-управляемый вход кальция в цитозоль. На данный момент показано, что дисфункция данных белков в кардиомиоцитах может приводить к различным патологиям: гипертрофии сердца, фиброзу, нарушению проводящей функции сердца (Ruhle & Trebak 2013; Troupes et al.,

2017). Одной из серьезнейших сердечных патологий, затрагивающей, в том числе, функционирование скелетных мышц, является миодистрофия Дюшенна. Это заболевание при котором нарушен синтез одного из основных белков цитоскелета клетки — дистрофина. Из-за отсутствия данного белка клетки быстро гибнут и несмотря на регенерационный потенциал мышечной ткани, данное заболевание в короткий срок приводит к летальному исходу. К настоящему времени все ещё не существует эффективной терапии, а все лечение сводится к лечению симптомов, а не причины. Белки цитоскелета являются каркасом клетки, взаимодействующим со многими другими белками, как цитозольной, так и мембранной локализации. Таким образом, нарушение этих связей может приводить, в том числе, к нарушению работы аппарата мембранного транспорта. В этой связи интересно проверить возможное влияние патологических нарушений клеточного цитоскелета в дистрофин-нокаутных мышцах на экспрессионный профиль белков, отвечающих за депо-управляемый вход кальция.

В данном исследовании мы сравнили уровни экспрессии белков депо-управляемого входа кальция в мышечной модели миодистрофии Дюшенна у мышей дикого типа с модельной линией — mdx.

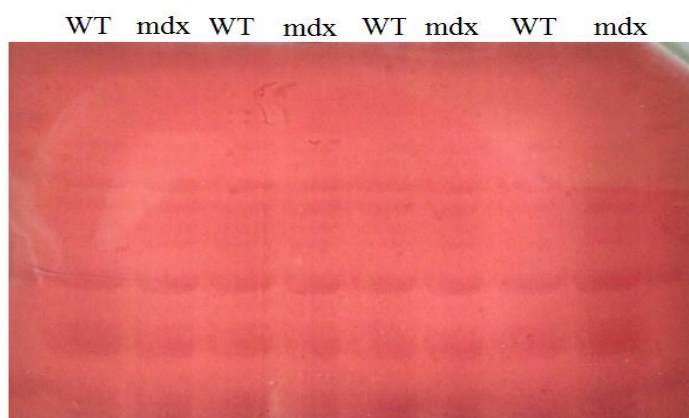
На сегодняшний день мышечная модель миодистрофии Дюшенна является наиболее успешной, хотя существуют определенные недостатки. У мышей показано легкое течение данного заболевания, не приводящего к летальному исходу, в отличие от человека, для которого данное заболевание может привести к летальному исходу в течении первых лет жизни. Данную особенность не стоит связывать только с короткой продолжительностью жизни у мышей. Существуют разные гипотезы, объясняющие этот феномен. Например, одни ученые объясняют это различными регенерационными потенциалами мышечной ткани у человека и мыши из-за разной длины теломерных повторов, у мышей они больше (Sacco et al., 2010).

В нашей работе мы использовали шесть различных лизатов (по три из клеток мышей дикого типа и три миодистрофийных мышей). После получения клеточных лизатов мы проводили электрофоретическое разделение белков в 8% ПААГ в денатурирующих условиях. После разделения белков гели окрашивали кумасси G-250, чтобы проверить качество разделения белков. Все целевые белки хорошо разделяются, результаты окраски кумасси до и после переноса белков на PVDF-мембрану показаны на рис.3.5 А,Б соответственно.



**Рис.3.5 Электрофореграмма белков окрашенная кумасси G-250 (А,Б).** После электрофоретического разделения (А) и после влажного электропереноса белков на PVDF-мембрану (Б). Дорожки с нанесением проб обозначены: WT (wild type) – лизаты кардиомиоцитов мышей дикого типа, mdx – лизаты кардиомиоцитов мышей с миодистрофией Дюшенна и М – коммерческий белковый маркер для идентификации молекулярных масс.

После разделения белков осуществляли влажный электроперенос белков на PVDF-мембрану. Качество переноса оценивали с помощью обратной окраски мембран органическим красителем Понсо-S red (рис.3.6).

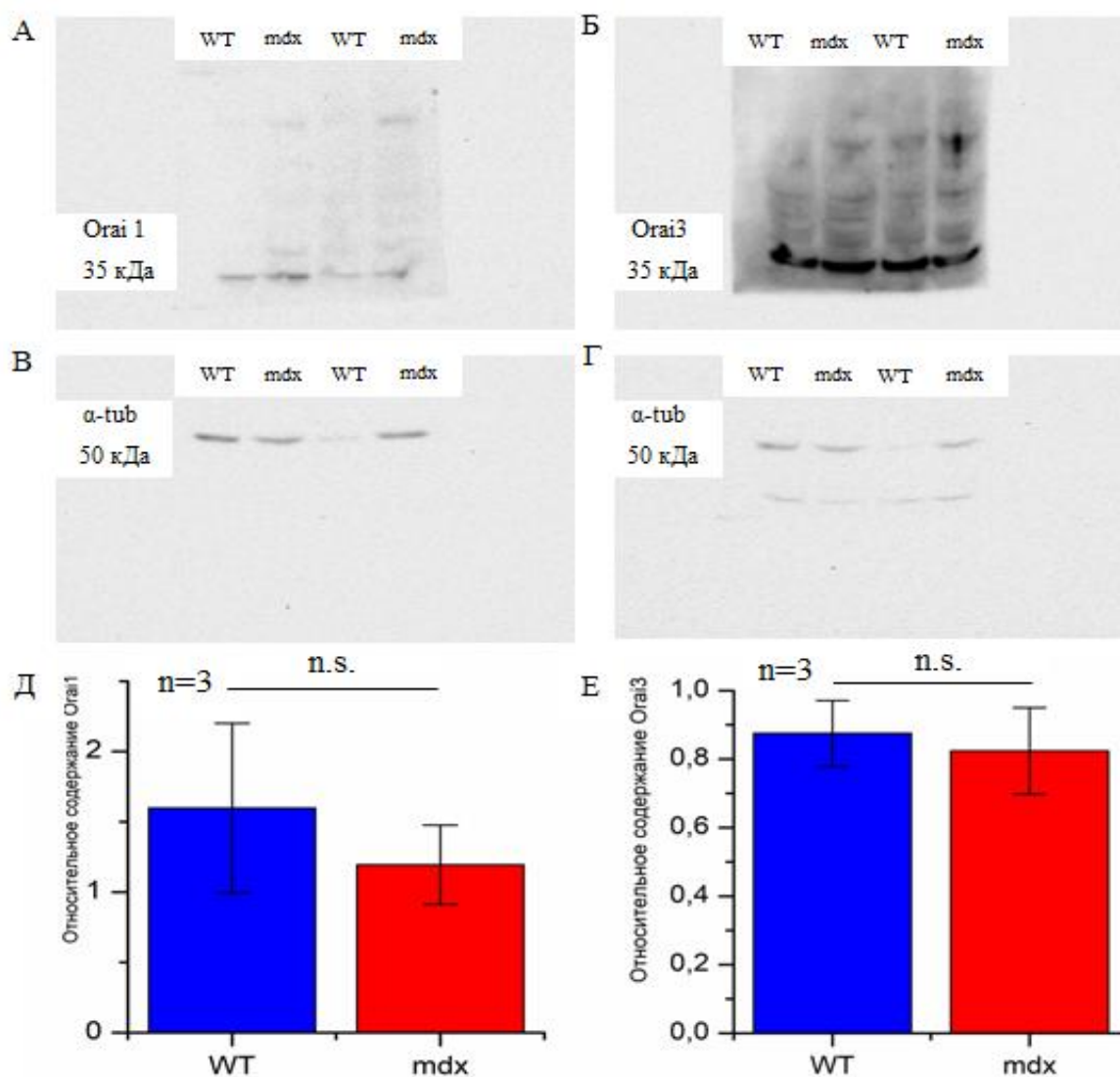


**Рис. 3.6 PVDF-мембрана окрашенная Понсо-S red после влажного электропереноса белков.** Дорожки с нанесением проб обозначены: *WT* (*wild type*) – лизаты кардиомиоцитов мышей дикого типа, *mdx* – лизаты кардиомиоцитов мышей с миодистрофией Дюшенна.

После переноса белков на мембраны, их инкубировали с первыми антителами к соответствующим целевым белкам, а после со вторыми антителами конъюгированные с пероксидазой хрена. После чего проводили детекцию белков в режиме хемилюминесценции. Нормирование количества белка в пробе осуществляли по мажорному белку — тубулину.

К сожалению, белки STIM1/2 и TRPC не прокрасились, а часть приготовленных лизатов содержала недостаточное для детекции количество белка. Вероятно, данная проблема связана со скоропортящимися специфическими антителами к данным белкам. В дальнейшем после закупки новых антител планируется продолжить работу в этом направлении.

В ходе иммуноблоттинга нам удалось зафиксировать наличие белков Orai1 (рис. 3.7 А) и Orai3 (рис. 3.7 Б) в лизируемых клетках. Содержание целевых белков Orai1 и Orai3 нормировали по мажорному белку  $\alpha$ -тубулину (рис.3.7 В,Г). Однако, статистически значимой разницы между их количеством в пробах мышей дикого типа и мышей *mdx* обнаружено не было (рис. 3.7 Д,Е).



**Рис. 3.7 Иммуноблоттинг белков Orai1 и Orai3 (А-Е).** Репрезентативный иммуноблотт белка Orai1 (А), нормированный по α-тубулину (В). Относительное содержание Orai1 в пробах с учетом стандартной ошибки средней (Д). Репрезентативный иммуноблотт белка Orai3 (Б), нормированный по α-тубулину (Г). Относительное содержание в пробах с учетом стандартной ошибки средней (Е). Дорожки с нанесением проб обозначены: WT (wild type) – лизаты кардиомиоцитов мышей дикого типа, mdx – лизаты кардиомиоцитов мышей с миодистрофией Дюшенна.

Таким образом, для каналоформерных белков семейства Orai не было обнаружено значимых отличий в уровнях содержания в кардиомиоцитах полученных из мышей дикого типа или mdx мышей. Для изучения экспрессионного профиля других белков, принимающих участие в депо-управляемом входе кальция в клетки, необходимы дальнейшие исследования.

## Заключение

В данной работе мы проверяли гипотезу о наличии депо-управляемого входа кальция в зрелых кардиомиоцитах. К настоящему моменту практически отсутствуют электрофизиологические записи депо-управляемых токов кальция в зрелых кардиомиоцитах, а его роль в остается противоречивой.

В ходе работы нам удалось электрофизиологически зафиксировать депо-управляемые токи кальция у мышей дикого типа. Полученные данные позволяют сделать вывод о наличии депо управляемого входа кальция в зрелых кардиомиоцитах без патологий. Таким образом, мы можем заключить, что гипотезы о наличии депо-управляемого входа кальция исключительно в неонатальных кардиомиоцитах являются несостоятельными. Тем не менее его функциональная роль в клетке пока не ясна и, вероятно, не связана с сократительной функцией кардиомиоцитов. Можно предположить, что депо-управляемый вход кальция участвует в активации кальций-зависимых транскрипционных факторов, по аналогии как показано на неонатальных кардиомиоцитах, где депо-управляемый вход кальция участвует в модуляции NFAT сигналинга, нарушение которого приводит к гипертрофии кардиомиоцитов (Voelkers et al., 2010).

К сожалению, нам пока не удалось провести аналогичные эксперименты на зрелых кардиомиоцитах мышцы линии mdx, поэтому вопрос об участии депо-управляемого входа кальция в развитии миодистрофии Дюшенна остаётся открытым.

Мы записали потенциал управляемые кальциевые тока через каналы L-типа. Полученные нами данные показывают отсутствие разницы в амплитудах кальциевых токов у взрослых мышей дикого типа и линии mdx, что согласуется с литературными данными.

Результаты биохимических исследований показывают отсутствие разницы в экспрессии основных каналообразующих белков депо-управляемого входа кальция – Orai1 и Orai3.

## **Выводы**

Подобраны оптимальные условия для выделения культуры кардиомиоцитов желудочков сердца взрослой мыши.

Амплитуды кальциевых токов через потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа в первичной культуре вентрикулярных кардиомиоцитов статистически неразличимы у мышей дикого типа и линии mdx.

Впервые электрофизиологически зафиксирован депо-управляемый вход кальция, имеющий компоненту, чувствительную к селективному блокатору CRAC каналов – 2-APB (2-аминоэтоксидифенилборат) в кардиомиоцитах желудочков сердца взрослой мыши дикого типа.

Установлено отсутствие статистически значимых различий в уровнях содержания белков Orai1 и Orai3 в кардиомиоцитах желудочков сердца взрослой мыши дикого типа и mdx.

## Список цитируемой литературы

1. Agnese Secondo, Secondo A, Bagetta G, Amantea D. 2018. On the Role of Store-Operated Calcium Entry in Acute and Chronic Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci*. 2018 Mar 22; 11:87. doi: 10.3389/fnmol.2018.00087.
2. Allbritton N., Meyer T., Stryer L. 1992. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science*. 258: 1812-1815.
3. Baker, Thompson, Hawkins, 2018. The novel sodium channel modulator GS-458967 (GS967) is an effective treatment in a mouse model of SCN8A encephalopathy. *Epilepsia*.; 00:1–11.
4. Bartoli, F., and Sabourin, J. 2017. Cardiac remodeling and disease: current understanding of STIM1/Orai1-mediated store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in cardiac function and pathology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 993, 523–534. doi: 10.1007/978-3-319-57732-6\_26
5. Bénard, L., Oh, J. G., Cacheux, M., Lee, A., Nonnenmacher, M., Matasic, D. S., et al. 2016. Cardiac Stim1 silencing impairs adaptive hypertrophy and promotes heart failure through inactivation of mTORC2/Akt signaling. *Circulation* 133, 1458–1471; discussion: 1471. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020678
6. Berridge M.J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signaling. *J. Exper. Biol.* 200: 315-319.
7. Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. 1998. Calcium - a life and death signal. *Nature*. 395: 645-648.
8. Betzenhauser M.J., Pitt G.S., Antzelevitch C. 2015. Calcium Channel Mutations in Cardiac Arrhythmia Syndromes // *Curr Mol Pharmacol.*, 8(2): 133–142.
9. Bootman, M. D., and Rietdorf, K. 2017. Tissue specificity: store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in cardiac myocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 993, 363–387. doi: 10.1007/978-3-319-57732-6\_19
10. Bouron A., Altafaj X., Boisseau S., De Waard M. A. 2005. Store-operated Ca<sup>2+</sup> influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores is developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice // *Brain Res. Dev. Brain Res.*. 159(1): 64–71.
11. Brandman O., Liou, J., Park, W.S., Meyer T. 1981. STIM2 is a feedback regulator that stabilize basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> levels // *Cell*. 2009 T. 131 № 7 C. 1327–1339.
12. Casteels, R., and Droogmans, G. 1981. Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. *J. Physiol.* 317, 263–279. doi: 10.1113/jphysiol. sp 013824
13. Collins, H.E., He, L., Zou, L., Qu, J., Zhou, L., Litovsky, S. H., et al. 2014. Stromal interaction molecule 1 is essential for normal cardiac homeostasis through modulation of ER and mitochondrial function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 306, H1231–H1239. doi: 10.1152/ajpheart.00075.2014
14. Collins H.E., Zhu-Mauldin X., Marchase R.B., Chatham J.C. 2013. STIM1/Orai1-mediated SOCE: current perspectives and potential roles in cardiac function and pathology // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 305(4): H446–458.
15. Cooper A. 1824. A treatise on dislocations, and on fractures of the joints, 4th edn. Longman, Hurst, Rees, Orme, Brown and Green, London
16. Correll, R.N., Goonasekera, S.A., van Berlo, J.H., Burr, A.R., Accornero, F., Zhang, H., et al. 2015. STIM1 elevation in the heart results in aberrant Ca<sup>2+</sup> handling and cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 87, 38–47. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.07.03
17. Desai, P.N., Zhang, X., Wu, S., Janoshazi, A., Bolimuntha, S., Putney, J.W., et al. 2015. Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1



- message. *Sci. Signal.* 8, ra74. doi: 10.1126/scisignal.aaa8323
18. Dionisio, N., Smani, T., Woodard, G. E., Castellano, A., Salido, G. M., and Rosado, J. A. 2015. Homer proteins mediate the interaction between STIM1 and Cav1.2 channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 1145–1153. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.02.014
  19. Dirksen, R. T. 2009. Checking your SOCCs and feet: the molecular mechanisms of Ca<sup>2+</sup> entry in skeletal muscle. *J. Physiol.* 587, 3139–3147. doi: 10.1113/jphysiol.2009.172148
  20. Donald M. Bers, 2001. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.*, Second Edition, USA
  21. Eder, P., and Molkentin, J.D. 2011. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 108, 265–272. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.225888
  22. Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., et al. 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179–185. doi: 10.1038/nature04702
  23. Frischauf, I., Muik, M., Derler, I., Bergsmann, J., Fahrner, M., Schindl, R., et al. 2009. Molecular determinants of the coupling between STIM1 and Orai channels: differential activation of Orai1-3 channels by a STIM1 coiled-coil mutant. *J. Biol. Chem.* 284, 21696–21706. doi: 10.1074/jbc.M109.018408
  24. Hamill O.P., Sakmann B. Multiple conductance states of single acetylcholine receptor 71 channels in embryonic muscle cells. // *Nature*. 1981. 294(5840): 462–464.
  25. Heineke, J., and Molkentin, J.D. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 589–600. doi: 10.1038/nrm1983
  26. Hille B. 2001. *Ion channels of excitable membranes.* 3rd Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA.
  27. Horton, J.S., Buckley, C.L., Alvarez, E.M., Schorlemmer, A., and Stokes, A.J. 2014. The calcium release-activated calcium channel Orai1 represents a crucial component in hypertrophic compensation and the development of dilated cardiomyopathy. *Channels Austin Tex* 8, 35–48. doi: 10.4161/chan.26581
  28. Hoth, M., and Penner, R. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353–356. doi: 10.1038/355353a0
  29. Hunton, D.L., Lucchesi, P.A., Pang, Y., Cheng, X., Dell'Italia, L. J., and Marchase, R.B. 2002. Capacitative calcium entry contributes to nuclear factor of activated T-cells nuclear translocation and hypertrophy in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 14266–14273. doi: 10.1074/jbc.m107167200
  30. Hunton, D.L., Zou, L., Pang, Y., and Marchase, R.B. 2004. Adult rat cardiomyocytes exhibit capacitative calcium entry. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1124–H1132. doi: 10.1152/ajpheart.00162.2003
  31. Hulot, J. S., Fauconnier, J., Ramanujam, D., Chaanine, A., Aubart, F., Sassi, Y., et al. 2011. Critical role for stromal interaction molecule 1 in cardiac hypertrophy. *Circulation* 124, 796–805. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111. 031229
  32. Ju, Y.K., Lee, B.H., Trajanovska, S., Hao, G., Allen, D.G., Lei, M., et al. 2015. The involvement of TRPC3 channels in sinoatrial arrhythmias. *Front. Physiol.* 6:86. doi: 10.3389/fphys.2015.00086
  33. Koenig X., Lena Rubi, Gerald J. Obermair, Rene Cervenka. 2014. Enhanced currents through L-type calcium channels in cardiomyocytes disturb the electrophysiology of the dystrophic heart *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 306(4): H 564-H573. Doi:10.1152/ajpheart.00441.2013.
  34. Kojima, A., Kitagawa, H., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., and Nosaka, S. 2012. Presence of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in C57BL/6J mouse ventricular myocytes and its suppression by sevoflurane. *Br. J. Anaesth.* 109, 352–360. doi: 10.1093/bja/aes212
  35. Kwan, C.Y., Takemura, H., Obie, J.F., Thastrup, O., and Putney, J.W. Jr. 1990. Effects of

- MeCh, thapsigargin, and  $\text{La}^{3+}$  on plasmalemmal and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transport in lacrimal acinar cells. *Am. J. Physiol.* 258, C1006–C1015.doi: 10.1152/ajpcell.1990.258.6.C1006 Kwan, H. Y., Shen, B., Ma, X., Kwok
36. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.*, Vol. 227(5259). – P. 680–685.
  37. Lee K. Yuan, J.P., Hong, J.H., Worley, P.F An Endoplasmic Reticulum/Plasma Membrane Junction: STIM1/ Orai1/TRPCs // *FEBS Lett.* 2011 T. 584 № 10 C. 2022–2027.
  38. Marx S.O., Marks A.R. Dysfunctional ryanodine receptors in the heart: new insights into complex cardiovascular diseases // *J Mol Cell Cardiol.* 2013, 58: 225–231.
  39. Liou J., Kim, M.,Heo, W.,Jones, J.T., Myers, J.W., James, E., Jr, Ferrell., Meyer, T. 2005. STIM is a  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor Essential for  $\text{Ca}^{2+}$ -Store-DepletionTriggered  $\text{Ca}^{2+}$  Influx // *Curr. Biol.* T. 15 № 13 C. 1235–1241
  40. Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., et al. 2007. CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels with distinct functional properties. *Curr. Biol.* 17, 794–800. doi: 10.1016/j.cub.2007.03.065
  41. Liu X., Cheng K.T., Bandyopadhyay B.C., Pani B., Dietrich A., Paria B.C., Swaim W.D., Beech D., Yildirim E., Singh B.B., Birnbaumer L., Ambudkar I.S. 2007. Attenuation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1<sup>(-/-)</sup> mice. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(44): 17542–17547.
  42. Liu, J., Xin, L., Benson, V.L., Allen, D.G., and Ju, Y. K. 2015. Store-operated calcium entry and the localization of STIM1 and Orai1 proteins in isolated mouse sinoatrial node cells. *Front. Physiol.* 6:69. doi: 10.3389/fphys.2015.00069
  43. Lopez, J. J., Salido, G.M., and Rosado, J. A. 2017. Cardiovascular and Hemostatic disorders: SOCE and  $\text{Ca}^{2+}$  Handling in platelet dysfunction. *Adv. Exp. Med.Biol.* 993, 453–472. doi: 10.1007/978-3-319-57732-6\_23
  44. Luo X., Hojayeve B., Jiang N., Wang Z.V., Tandan S., Rakalin A., Rothermel B.A., Gillette T.G., Hill J.A. 2012. STIM1-dependent store-operated Ca entry is required for pathological cardiac hypertrophy // *J Mol Cell Cardiol.* 52(1): 136–147.
  45. Mason M.J., Garcia-Rodriguez C, Grinstein S. 1991. Coupling between intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and the  $\text{Ca}^{2+}$  permeability of the plasma membrane. Comparison of the effects of thapsigargin, 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone, and cyclopiazonic acid in rat thymic lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 20856- 20862.
  46. Mullins F.M., Park C.Y., Dolmetsch R.E., Lewis R.S. 2009. STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of CRAC channels // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(36): 15495–15500.
  47. Nguyen, N., Biet, M., Simard, E., Béliveau, E., Francoeur, N., Guillemette, G., et al. 2013. STIM1 participates in the contractile rhythmicity of HL-1 cells by moderating T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 1294–1303. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.02.027
  48. Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., et al. 2007. Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 498–507. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.10.020
  49. Pan Z., Brotto M., Ma J. 2014. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in muscle physiology and diseases // *BMB Rep.* 47(2): 69–79.
  50. Pang, Y., Hunton, D. L., Bounelis, P., and Marchase, R. B. 2002. Hyperglycemia inhibits capacitative calcium entry and hypertrophy in neonatal cardiomyocytes. *Diabetes* 51, 3461–3467. doi: 10.2337
  51. Parekh A.B., Putney J.W. 2005. Store-Operated Calcium Channels. // *Physiol Rew.* 85: 757–810.
  52. Parks, C., Alam, M.A., Sullivan, R., and Mancarella, S. 2016. STIM1-dependent  $\text{Ca}^{2+}$

- microdomains are required for myofilament remodeling and signaling in the heart. *Sci. Rep.* 6:25372. doi: 10.1038/srep25372
53. Poggioli J., Putney J.W. 1982. Net calcium fluxes in rat parotid acinar cells: evidence for a hormone-sensitive calcium pool in or near the plasma membrane. // *Pflugers Arch.* 392(3): 239–243.
54. Putney J.W. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* 7: 1-13.
55. Putney J.W. 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium.* 11:611-624.
56. Putney J.W. 1999. "Kissin' cousins": intimate plasma membrane - ER interactions underlie capacitative calcium entry. *Cell.* 99: 5-8.
57. Ringer S. 1883. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol.* 4: 29-42.
58. Rodríguez-Moyano, M., Díaz, I., Dionisio, N., Zhang, X., Avila-Medina, J., Calderón-Sánchez, E., et al. 2013. Urotensin-II promotes vascular smooth muscle cell proliferation through store-operated calcium entry and EGFR transactivation. *Cardiovasc. Res.* 100, 297–306. doi: 10.1093/cvr/cvt196
59. Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., et al. 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J. Cell Biol.* 169, 435–445. doi: 10.1083/jcb.200502019
60. Rosado, J. A. 2006. Discovering the mechanism of capacitative calcium entry. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C1104–C1106. doi: 10.1152/classicessays.00045.2006
61. Rosado, J. A., Diez, R., Smani, T., and Jardín, I. 2016. STIM and Orai1 variants in store-operated calcium entry. *Front. Pharmacol.* 6:325. doi: 10.3389/fphar.2015.00325
62. Rubi, L., Hannes Todt, Helmut Kubista, Xaver Koenig, Karlheinz Yilber, 2018. Calcium current properties in dystrophin-deficient ventricular cardiomyocytes from aged mdx mice *Physiol Rep*, 6 (1), 2018, e13567, doi: 10.14814/phy2.13567
63. Ruhle, B., and Trebak, M. 2013. Emerging roles for native Orai Ca<sup>2+</sup> channels in cardiovascular disease. *Curr. Top. Membr.* 71, 209–235. doi: 10.1016/B978-0-12-407870-3.00009-3
64. Sabourin, J., Bartoli, F., Antigny, F., Gomez, A. M., and Benitah, J.-P. 2016. Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)/Orai1-dependent Storeoperated Ca<sup>2+</sup> Channels: new targets of aldosterone in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 291, 13394–13409. doi: 10.1074/jbc.M115.693911
65. Sabourin, J., Robin, E., and Raddatz, E. 2011. A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart. *Cardiovasc. Res.* 92, 226–236. doi: 10.1093/cvr/cvr167
66. Saliba, Y., Keck, M., Marchand, A., Atassi, F., Ouillé, A., Cazorla, O., et al. 2015. Emergence of Orai3 activity during cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 105, 248–259. doi: 10.1093/cvr/cvu207
67. Sacco et al., Short Telomeres and Stem Cell Exhaustion Model Duchenne Muscular Dystrophy in mdx/mTR Mice, *Cell* 2010., doi:10.1016/j.cell.2010.11.03966.
68. Sarika Chaudhari and Rong Ma. 2016. Store-operated calcium entry and diabetic complications *Experimental Biology and Medicine*; 241: 343–352.
69. Shuttleworth T.J. 2012. Orai3 - the 'exceptional' Orai? // *J. Physiol.*, T. 590 № 2 C. 241–257.
70. Smyth J., Hwang S., Tomita T., DeHaven W., Mercer J., Putney J., Activation and regulation of store-operated calcium entry // *J Cell Mol Med.* 2010. 14: 2337–2349
71. Stiber, J.A., and Rosenberg, P.B. 2011. The role of store-operated calcium influx in skeletal

- muscle signaling. *Cell Calcium* 49, 341–349. doi: 10.1016/j.ceca.2010.11.012
72. Touchberry, C.D., Elmore, C.J., Nguyen, T.M., Andresen, J.J., Zhao, X., Orange, M., et al. 2011. Store-operated calcium entry is present in HL-1 cardiomyocytes and contributes to resting calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416, 45–50. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.133
73. Troupes, C.D., Wallner, M., Borghetti, G., Zhang, C., Mohsin, S., von Lewinski, D., et al. 2017. Role of STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1) in hypertrophy-related contractile dysfunction. *Circ. Res.* 121, 125–136. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311094
74. Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J. 1984. Measuring and manipulating cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  with trapped indicators. *Trends Biochem. Sci.* 9: 263–266.
75. Uehara, A., Yasukochi, M., Imanaga, I., Nishi, M., and Takeshima, H. 2002. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell Calcium*
76. Vig, M., Beck, A., Billingsley, J.M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., et al. 2006. CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr. Biol.* 16, 2073–2079. doi: 10.1016/j.cub.2006.08.085
77. Voelkers, M., Salz, M., Herzog, N., Frank, D., Dolatabadi, N., Frey, N., et al. 2010. Orai1 and Stim1 regulate normal and hypertrophic growth in cardiomyocytes. *J.Mol. Cell. Cardiol.* 48, 1329–1334. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010. 01.020
78. Wang, P., Umeda, P.K., Sharifov, O.F., Halloran, B.A., Tabengwa, E., Grenett, H.E., et al. 2012. Evidence that 2-aminoethoxydiphenyl borate provokes fibrillation in perfused rat hearts via voltage-independent calcium channels. *Eur. J. Pharmacol.* 681, 60–67. doi: 10.1016/j.ejphar.2012. 01.045
79. Wen H., Zhao Zhenghang., Fefelova Nadezhda., Allen Charelle., Xie Lai-Hua. 2011. Arrhythmogenic effect of store-operated calcium entry in mouse ventricular myocytes (Abstract) // *Circulation.*, 124: A15884.
80. Wolkowicz, P.E., Huang, J., Umeda, P.K., Sharifov, O.F., Tabengwa, E., Halloran, B.A., et al. 2011. Pharmacological evidence for Orai channel activation as a source of cardiac abnormal automaticity. *Eur. J. Pharmacol.* 668, 208–216. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.06.025
81. Zhao, G., Li, T., Brochet, D.X. P., Rosenberg, P.B., and Lederer, W.J. 2015. STIM1 enhances SR  $\text{Ca}^{2+}$  content through binding phospholamban in rat ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E4792–E4801. doi: 10.1073/pnas.1423295112
82. Zhang, H., Sun, A. Y., Kim, J.J., Graham, V., Finch, E.A., Nepliouev, I., et al. 2015. STIM1- $\text{Ca}^{2+}$  signaling modulates automaticity of the mouse sinoatrial node. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E5618–E5627. doi: 10.1073/pnas.1503847112
83. Zhou Y., Mancarella S., Wang Y., Yue C., Ritchie M., Gill D.L., Soboloff J. 2009. The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels. // *J Biol Chem.* 284(29): 19164–19168.
84. Zhu-Mauldin, X., Marsh, S.A., Zou, L., Marchase, R.B., and Chatham, J.C. 2012. Modification of STIM1 by O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) attenuates store-operated calcium entry in neonatal cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 39094–39106. doi: 10.1074/jbc.M112.383778